ULTIM'ORA STUDIO: mRNA vaccinale, DNA plasmide e proteine Spike possono persistere negli esseri umani più di 3,5 anni dopo la vaccinazione anti COVID-19
Segnaliamo la più lunga persistenza documentata dei componenti del vaccino mRNA fino ad oggi, confermata indipendentemente da diversi laboratori, biospecimen e punti temporali utilizzando diversi metodi analitici.
Per anni, al pubblico è stato detto che i materiali vaccini mRNA si sarebbero degradati in pochi giorni - rapidamente distrutti, biologicamente transitori e incapaci di persistere a lungo termine. Questa assunzione ha plasmato garanzie normative, messaggi pubblici e aspettative di sicurezza in tutto il mondo. Miliardi in tutto il mondo hanno ricevuto queste iniezioni sulla base dell'affermazione che il materiale genetico sarebbe rapidamente scomparso dal corpo.
Oggi, quella narrazione crolla - a seguito di uno sforzo investigativo coordinato e multinazionale che coinvolge la Fondazione McCullough, il laboratorio INMODIA (Germania), l'ospedale municipale Dresda-Friedrichstadt (Germania), Neo7Bioscience e laboratori indipendenti collaboratori.
L'articolo risultante, intitolato "Unprecedented Persistence of Vaccine mRNA, plasmid DNA, Spike Protein e Disregolation Genomica oltre 3,5 anni dopo la vaccinazione mRNA contro il COVID-19", presenta quello che, per quanto ne sappiamo, è il più completo report sui casi di lesioni da vaccino anti COVID-19 finora.
Un uomo di 55 anni ha sviluppato una disfunzione progressiva multiorgano a seguito di tre dosi di mRNA Pfizer, tra cui emboli polmonare, miocardite confermata dalla risonanza magnetica, neuropatia delle piccole fibre, disfunzione autonoma, compromissione neurocognitiva, coinvolgimento cronico del gastrointestinale, perdita dell'udito sensoriale, infiammazione dermatologica e ansia/depressione.
La valutazione diagnostica è stata straordinaria:
Oltre 40 visite al pronto soccorso
Oltre 200 incontri specialistici (18 discipline)
Oltre 100 indagini di laboratorio
100+ studi di immagini/funzionali
Sono state sistematicamente escluse cause infettive, autoimmuni, reumatologiche, endocrine, genetiche, ematologiche, maligne, tossiche/medicazioni, cardiovascolari, metaboliche e neurologiche primarie.
L'infezione da SARS-CoV-2 è stata effettivamente esclusa:
🚫
dopo la vaccinazione, confermati da 3 laboratori indipendenti.
🚫
la vaccinazione, nonostante la deposizione chiara di proteine spike negli stessi esemplari.
📈Nel frattempo, gli anticorpi spike sono rimasti persistentemente elevati, inclusi 4,553 U/mL nel gennaio 2026 (1.433 giorni dopo la vaccinazione).
Il campionamento seriale di sangue e tessuti (852-1.364 giorni dopo la vaccinazione) ha rivelato:
📍Giorno 852 — Proteina SARS-CoV-2 S1 rilevata all'interno di sottoinsiemi monociti classici e non classici tramite analisi citometrica immunitaria a base di sangue/flusso, con anomalie delle citochine associate.
📍Giorno 1.173 — Proteina spike di Wuhan libera rilevata nel plasma (129,0 ± 4,1 fg/mL) da ELISA ad alta sensibilità.
📍Giorno 1.173 — Proteina Spike rilevata negli esosomi circolanti (11,6 ± 0,1 fg/mL) da ELISA ad alta sensibilità a seguito di isolamento esosomico.
📍
utilizzando estrazione di RNA trattato con DNase e primer specifici per ampliconi che prendono di mira tre regioni ORF spike (S1-S3). L'RNA PBMC era negativo.
📍Giorni 1.173 e 1.284 — Concentrazioni di IgG4 specifiche persistentemente elevate (354,4 ± 22,4 ng/mL; 320,2 ± 4,4 ng/mL) identificate mediante profilazione sierologica, coerenti con un'esposizione sostenuta agli antigene.

Le biopsie cutanee serie hanno dimostrato:
📍
immunoistochimica automatizzata con correlazione istopatologica; proteina nucleocapside assente.
📍
immunitari mediante immunoistochimica; nucleocapside assente.
📍
immunoistochimica; nucleocapside assente nello stesso esemplare.
📍Giorno 1.364 — Elementi di DNA plasmidico rilevati nei tessuti cutanei — comprese sequenze geniche spike (S1-S3), ori1/ori2 e frammenti di potenziatore SV40 — confermati dall'amplificazione PCR con elettroforesi in gel di agarosio e sequenziamento Sanger.
L'analisi della variante strutturale del sequenziamento del genoma completo a 1.277 giorni dopo la vaccinazione ha rivelato una diffusa instabilità genomica, con grandi duplicazioni e cancellazioni che interessano EGFR, MYC, ERBB2 ed ETV6/RUNX1, mentre il confronto RNA-DNA ha mostrato varianti solo RNA nei percorsi ribosomali, NMD, small-RNA, epigenetici e TP53.
Profilazione trascriptomica del sangue intero evidenzia stress ossidativo, attivazione vascolare e fragilità nucleare.
Le proteomiche delle urine che utilizzano spettrometria di massa quantitativa hanno confermato l'infiammazione sistemica con sovraattivazione del complemento (CFH), squilibrio redox (PRDX1), e risposte anticorpali sostenute, supportate da alleli di rischio HLA-B07:02 e DRB1*11:04.
Questa indagine longitudinale multilaboratorio fornisce prove dirette che il materiale genetico derivato dal vaccino mRNA e i suoi prodotti proteici tradotti possono persistere negli esseri umani per anni dopo la somministrazione, con un rilevamento riproducibile in diversi laboratori indipendenti, compartimenti biologici distinti e sistemi complementari di rilevazione molecolare che si estendono oltre 3,5 anni dopo la f dose inale.
Le proteine spike, le sequenze di mRNA spike e gli elementi della spina dorsale plasmidale sono stati identificati sia nelle cellule immunitarie che nel tessuto somatico, con l'assenza continua di proteine nucleocapsidi SARS-CoV-2, escludendo efficacemente l'infezione precedente come fonte.
Parallelamente, analisi multiomiche hanno rivelato una costante instabilità genomica e una disregolazione trascrittomica più di 3,5 anni dopo la vaccinazione, suggerendo che il materiale persistente derivato dal vaccino può essere associato ad alterazioni a lungo termine nelle vie genomiche e molecolari dell'ospite.
Sì, ci hanno mentito.

Lo studio tradotto in italiano

Caso clinico

Persistenza senza precedenti di mRNA vaccinale, DNA plasmidico, proteina spike e disregolazione genomica oltre 3,5 anni dopo la vaccinazione con mRNA anti-COVID-19

Nicolas Hulscher, MPH //' [1] *, Vanessa Schmidt, PhD .'[2] , Michael Mörz, MD', Claire Rogers, PA-C ' - ', Natalia von Ranke, PhD' ' [4] , Wei Zhang, PhD' [4] , John A. Catanzaro ND, PhD " [4] , Peter A. McCullough MD, MPH"*

Fondazione McCullough, Dallas, TX

'Ininodia GmbH, Istituto di diagnostica molecolare, Wittgasse 9, 94032 Passau, Germania

'Istituto di Patologia 'Georg Schinorl', Ospedale Municipale di Dresda-Friedrichstadt, Friedriclistrasse 41, 01067 Dresda, Germania.

[4] Neo7Bioscience, Inc, Dallas, TX

*Corrispondenza:nichulscher@gmail.com (Nicolas Hulscher)

Dichiarazione di finanziamento: Non è stato ricevuto alcun finanziamento per la realizzazione di questo caso di studio.

Dichiarazione di consenso informato: è stato ottenuto il consenso informato scritto dal paziente per la pubblicazione di questo caso clinico e delle immagini che lo accompagnano.

Dichiarazione di conflitto di interessi: gli autori dichiarano l'assenza di conflitti di interesse.

Ringraziamenti: Nessuno.

Numero di parole: 10814

Abstract

Contesto: La biodistribuzione a lungo termine e la persistenza dei componenti dei vaccini a RNA contro il COVID-19 rimangono insufficientemente caratterizzate. Prove emergenti suggeriscono che l'espressione prolungata della proteina spike, l'RNA residuo e i frammenti di DNA plasmidico possono contribuire a sindromi multisistemiche post-vaccinazione.

Presentazione del caso: Riportiamo il caso di un uomo di 55 anni che ha ricevuto tre dosi del vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA e successivamente ha sviluppato una disfunzione multiorganica progressiva compatibile con la sindrome post-vaccinale COVID-19 (PCVS), che ha coinvolto i sistemi cardiopolmonare, neurologico, muscolo-scheletrico, gastrointestinale, autonomo, otorinolaringoiatrico, audiovestibolare, immunitario, oftalmico, dermatologico e psichiatrico. Le manifestazioni cliniche includevano: embolia polmonare; miocardite confermata da risonanza magnetica tardiva; deficit neurocognitivo; neuropatia delle piccole fibre; disfunzione autonomica; mialgia; coinvolgimento cronico del pancreas e dell'apparato gastrointestinale; peggioramento dell'acufene con perdita dell'udito neurosensoriale; disfagia vocale e disfonia; disturbi oftalmici; infiammazione dermatologica cronica; ansia/depressione. Il caso è stato valutato attraverso un'indagine clinica longitudinale multidominio straordinariamente approfondita, che ha compreso analisi molecolari, immunologiche, genetiche, proteomiche, trascrittomiche e tissutali, intraprese per caratterizzare i meccanismi della malattia ed escludere eziologie alternative.

Valutazione diagnostica: dopo **oltre 40** visite al pronto soccorso e oltre 200 visite ambulatoriali specialistiche, il paziente è stato sottoposto a oltre 100 esami di laboratorio non di routine e oltre 100 esami di imaging/funzionali. Questa valutazione ha sistematicamente escluso meccanismi eziologici sottostanti nei settori infettivo, autoimmune, reumatologico, endocrino, genetico, ematologico, maligno, tossico/correlato ai farmaci, cardiovascolare/vascolare, metabolico e neurologico primario. I test sono rimasti in gran parte non diagnostici. Dopo la diagnosi di miocardite, è stata sospettata una possibile infezione asintomatica non documentata/non diagnosticata che si manifestava come COVID lungo, e sono stati effettuati esami sierologici; i risultati inaspettati hanno portato ad ampliare i test immunologici e tissutali per i componenti derivati dal picco e dal vaccino. Gli anticorpi contro il nucleocapside del SARS-CoV-2 sono risultati negativi in cinque momenti distinti compresi tra 809 e 1.433 giorni dopo la vaccinazione, come confermato da tre laboratori indipendenti. Il paziente rimane negativo al nucleocapside con livelli persistentemente elevati di anticorpi contro la proteina spike (4.553 U/mL) 1.433 giorni dopo l'ultima vaccinazione.

Raccolta dei campioni e metodi analitici: i campioni di sangue e tessuto cutaneo sono stati prelevati in diversi momenti tra 852 e 1.364 giorni dopo la somministrazione dell'ultima dose del vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA. I compartimenti biologici analizzati includevano plasma, esosomi circolanti, cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) e tessuto cutaneo. I campioni sono stati valutati in diversi laboratori indipendenti utilizzando diverse metodologie analitiche, tra cui ELISA, immunoistochimica automatizzata, RT-PCR, PCR standard con conferma mediante sequenziamento Sanger, sequenziamento dell'intero genoma, profilazione trascrittomica e spettrometria di massa quantitativa.

Risultati molecolari circolanti: a 852 giorni dalla vaccinazione, i test immunitari sul sangue hanno identificato la presenza di proteina SI SARS-CoV-2 rilevabile all'interno di sottogruppi di monociti classici e non classici con anomalie associate delle citochine e dei marcatori immunitari. A 1.173 giorni dalla vaccinazione, l'ELISA ad alta sensibilità ha rilevato la proteina spike libera di Wuhan nel plasma (129,0 + 4,1 fg/mL) e negli esosomi circolanti (11,6 + 0,1 fg/mL). A 1.284 giorni, il test RT-PCR ha identificato mRNA spike derivato dal vaccino negli esosomi circolanti, mentre l'RNA PBMC è rimasto negativo dopo l'estrazione trattata con DNasi e la PCR specifica per l'amplicone mirata a tre regioni ORF spike (S1-S3). Il profilo sierologico a 1.173 e 1.284 giorni dopo la vaccinazione ha dimostrato concentrazioni persistentemente elevate di IgG4 specifiche per spike (rispettivamente 354,4 -L 22,4 ng/mL e 320,2 + 4,4 ng/mL), coerenti con una stimolazione antigenica in corso e una risposta sbilanciata di tolleranza immunitaria.

Risultati molecolari e istopatologici a livello tissutale: le biopsie cutanee seriali effettuate a 1.160, 1.249 e 1.364 giorni dopo la vaccinazione, tutte prelevate dalla cute del tronco in aree clinicamente attive della malattia di Grover, erano negative al nucleocapside e hanno dimostrato un deposito persistente di proteina spike nelle cellule endoteliali e nei macrofagi mediante immunoistochimica automatizzata con correlazione istopatologica. La proteina spike è stata trovata anche nelle fibre nervose a 1.364 giorni. La biopsia cutanea a 1.364 giorni conteneva molteplici elementi di DNA plasmidico, tra cui sequenze del gene spike (S1-S3), oril/ori2 e l'enhancer SV40, confermando la ritenzione duratura del DNA derivato dal vaccino nel tessuto somatico mediante amplificazione PCR con elettroforesi su gel di agarosio e sequenziamento Sanger.

Analisi multi-omica: l'analisi delle varianti strutturali del sequenziamento dell'intero genoma a 1.277 giorni dalla vaccinazione ha rivelato una diffusa instabilità genomica, con grandi duplicazioni e delezioni che interessano EGFR, MYC, ERBB2 ed ETV6/RUNX1, mentre il confronto RNA-DNA ha mostrato varianti solo RNA nei percorsi ribosomiali, NMD, small-RNA, epigenetici e TP53. Il profilo trascrittomico del sangue intero ha evidenziato stress ossidativo, attivazione vascolare e fragilità nucleare. La proteomica urinaria mediante spettrometria di massa quantitativa ha confermato l'infiammazione sistemica con iperattivazione del complemento (CFH), squilibrio redox (PRDXI) e risposte anticorpali prolungate, supportate dagli alleli di rischio HLA-B07:02 e DRB1*11:04.

Conclusione: questo caso documenta la più lunga persistenza in vivo segnalata di mRNA derivato dal vaccino, frammenti di DNA plasmidico e proteina spike dopo la vaccinazione con mRNA, con rilevamento riproducibile in più laboratori indipendenti, compartimenti biologici distinti e sistemi di rilevamento molecolare complementari che si estendono oltre 3,5 anni dopo la dose finale. La proteina spike, le sequenze di mRNA spike e gli elementi della struttura del plasmide sono stati identificati sia nelle cellule immunitarie che nel tessuto somatico, con la continua assenza della proteina nucleocapside SARS-CoV-2 o di anticorpi, escludendo efficacemente una precedente infezione come fonte. La convergenza di queste osservazioni attraverso campionamenti longitudinali di sangue e tessuti fornisce una prova diretta che il materiale genetico derivato dal vaccino mRNA e i suoi prodotti proteici tradotti possono persistere in vivo per anni dopo la somministrazione. Parallelamente, analisi multi-omiche hanno rivelato una instabilità genomica sostenuta e una disregolazione trascrittomica più di 3,5 anni dopo la vaccinazione, suggerendo che il materiale persistente derivato dal vaccino possa essere associato ad alterazioni a lungo termine nei percorsi genomici e molecolari dell'ospite. Questi dati mettono in discussione le ipotesi prevalenti riguardo alla rapida degradazione e all'attività biologica di breve durata dei componenti del vaccino a mRNA e sottolineano la necessità di studi longitudinali controllati per determinare la prevalenza, i meccanismi e le conseguenze cliniche del materiale persistente derivato dal vaccino.

Introduzione

I vaccini a mRNA contro il COVID-19 sono stati rapidamente distribuiti dal governo degli Stati Uniti con autorizzazione all'uso di emergenza alla fine del 2020 a causa della diffusione globale della SARS-CoV-2 [1]. Poiché al momento della distribuzione gli studi clinici non erano stati completati, i potenziali effetti avversi erano sconosciuti. Di particolare importanza erano le implicazioni sconosciute per la codifica della proteina spike altamente infiammatoria, uno dei componenti più tossici del virus COVID-19 [2,3]. È stato scoperto che l'mRNA del vaccino incapsulato in nanoparticelle lipidiche (LNP) penetra nel cervello umano [4] e nel cuore [5]. Dopo che le LNP si depositano in vari organi del corpo [6], la proteina spike viene espressa all'interno di quelle cellule per una durata sconosciuta, provocando una risposta infiammatoria in quel sistema organico [2]. Di conseguenza, i pazienti che soffrono della sindrome post-vaccinale da COVID-19 (PCVS) presentano una miriade di sintomi che coinvolgono più sistemi organici [7]. La miocardite è ora riconosciuta come una grave reazione avversa al vaccino COVID-19, più frequente nei giovani adulti di sesso maschile, ma non limitata a questo gruppo [8]. Si ritiene che il meccanismo sia dovuto all'accumulo della proteina spike nei cardiomiociti che porta a infiammazione, potenziale cicatrizzazione e, in ultima analisi, danno al muscolo cardiaco [8]. Qui riportiamo un caso di sindrome multisistemica post-vaccinazione COVID-19 supportato da una valutazione longitudinale molecolare, immunologica, genetica, proteomica, trascrittomica e a livello tissutale particolarmente approfondita.

Presentazione del caso

Il paziente è un uomo di 55 anni con una storia di tromboembolia venosa postoperatoria, complicata da trombosi venosa profonda ed embolia polmonare all'età di 46 anni a seguito di un intervento chirurgico alla colonna lombare. Ha completato tre mesi di terapia anticoagulante, con imaging di follow-up che ha dimostrato la risoluzione; la valutazione della trombofilia non ha evidenziato anomalie. La storia clinica includeva una lieve perdita dell'udito con tinnito, pressione sanguigna intermittentemente elevata trattata occasionalmente con losartan a basso dosaggio e ansia occasionale. Gli esami fisici di routine precedenti, il punteggio di calcio coronarico e un test da sforzo cardiaco di base erano risultati normali.

Vaccinazione e primi sintomi sistemici

Il paziente ha ricevuto una serie di due dosi di vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA nel marzo 2021. A partire da maggio 2021, ha sviluppato sintomi sistemici episodici tra cui dolori muscolari, mal di testa, affaticamento e gonfiore, seguiti da disturbi otorinolaringoiatrici intermittenti (mal di gola, disturbi del sonno e sensazione di liquido nell'orecchio). Durante l'autunno 2021, ha sviluppato un dolore toracico persistente di lieve entità (tipicamente 2/10), affaticamento/malessere e respiro corto, che lo hanno spinto a sottoporsi a una valutazione ambulatoriale prima della sua prima visita al pronto soccorso. Il 28 ottobre 2021 si è presentato al pronto soccorso con tachicardia improvvisa e auto-risolvente (frequenza cardiaca 208 bpm) accompagnata da vertigini, disorientamento, respiro affannoso, difficoltà di concentrazione e diplopia. Gli esami sono stati limitati e i sintomi sono stati attribuiti all'ansia.

Embolia polmonare e follow-up

Si è ripresentato al pronto soccorso l'8 novembre 2021 con tachicardia e respiro affannoso; gli esami di laboratorio hanno evidenziato un elevato livello di D-dimero pari a 1,71 pg/mL FEU (intervallo di riferimento <0,22 pg/mL FEU). La TC toracica del 9 novembre 2021 ha evidenziato la presenza di piccoli emboli polmonari bilaterali multipli, che hanno richiesto il ricovero in ospedale, il rinvio a uno specialista e l'inizio di una terapia anticoagulante **(Figura 1).**

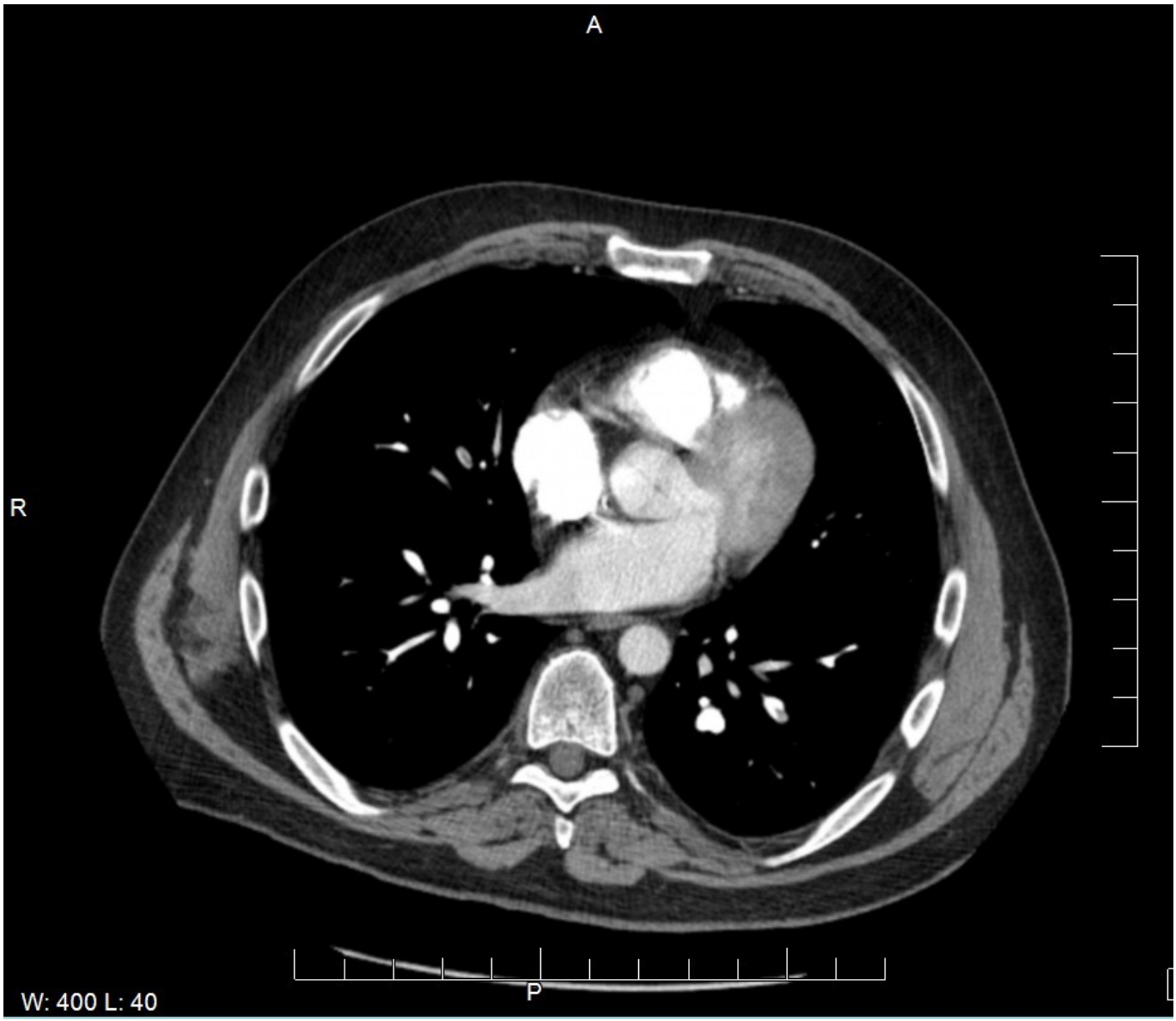

Figura 1. Angiografia polmonare mediante tomografia computerizzata (TC) che evidenzia un'embolia polmonare. Immagine assiale dell'angiografia polmonare **mediante TC** del 9 novembre 2021, che mostra molteplici piccoli emboli polmonari nei rami segmentali e subsegmentali dell'arteria polmonare sinistra. Gli emboli appaiono come difetti di riempimento intraluminale all'interno delle arterie polmonari opacizzate dal mezzo di contrasto, compatibili con un'embolia polmonare acuta. Questa diagnosi è stata formulata circa otto mesi dopo la seconda dose del vaccino a mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19 somministrata al paziente.

Due valutazioni della trombofilia (gennaio 2022 e dicembre 2022) non hanno evidenziato anomalie. Il paziente ha ricevuto un richiamo con vaccino a mRNA Pfizer-BioNTech il 20 febbraio 2022; la TC toracica del 22 febbraio 2022 ha dimostrato la risoluzione dell'embolia polmonare e ha descritto polmoni chiari senza segni infiammatori. I sintomi sono persistiti e si sono estesi a più sistemi.

Esacerbazione multisistemica dopo il richiamo

Dopo il richiamo con mRNA Pfizer-BioNTech del 20 febbraio 2022, il paziente ha riferito un'escalation dei sintomi multisistemici, con insorgenza tra marzo e aprile 2022 ed episodi più pronunciati di tachicardia, disturbi gastrointestinali, autonomici e neuropsichiatrici entro maggio 2022. I sintomi includevano cefalea con vertigini e diplopia/disturbi visivi intermittenti; peggioramento dell'acufene con perdita dell'udito neurosensoriale bilaterale; gonfiore e dolore addominale; peggioramento del dolore toracico con intolleranza allo sforzo; tachicardia con ipotensione e quasi sincope; dolore muscoloscheletrico sproporzionato rispetto allo sforzo; e nuova ansia grave. Ematospermia con

La prostatite è stata diagnosticata nel marzo 2022. Durante questo periodo, i sintomi sono stati spesso attribuiti all'ansia nel contesto post-embolia polmonare.

Nel luglio 2022, la TC toracica non ha evidenziato embolie polmonari ricorrenti, ma ha mostrato nuove opacità semisolide sparse a vetro smerigliato descritte come indicative di infezione o infiammazione; il paziente ha negato sintomi infettivi in quel momento. Ciò era in contrasto con una TC toracica chiara nel febbraio 2022.

Cardiologia

Tra il 2022 e il 2024, il paziente è stato sottoposto a una valutazione cardiaca approfondita, che includeva ecocardiogrammi transtoracici multipli che dimostravano dimensioni normali delle camere cardiache e funzione sistolica preservata; diversi test da sforzo e ecocardiogrammi da sforzo che erano normali dal punto di vista elettrocardiografico ed ecocardiografico, ma clinicamente sintomatici (dolore toracico, dispnea, vertigini e recupero prolungato della frequenza cardiaca); e monitoraggio ambulatoriale seriale del ritmo che ha evidenziato occasionali contrazioni atriali premature (PAC), occasionali contrazioni ventricolari premature (PVC) e breve tachicardia sopraventricolare (SVT) che si è risolta spontaneamente.

Il 28 maggio **2023,** durante un episodio di forte dolore toracico, il paziente ha registrato su un dispositivo di monitoraggio domiciliare una serie di episodi di ritmo idioventricolare auto-terminante **(Figura 2)**; il tracciato del ritmo è stato verificato da un medico. Questo risultato non ha richiesto l'esecuzione di ulteriori esami di imaging cardiaco avanzato. Durante questo periodo, nel reparto di pronto soccorso sono state menzionate miocardite e pericardite tra le diagnosi differenziali; tuttavia, il paziente è stato rassicurato sul fatto che tali diagnosi erano improbabili, nonostante non fosse stata eseguita una risonanza magnetica cardiaca.

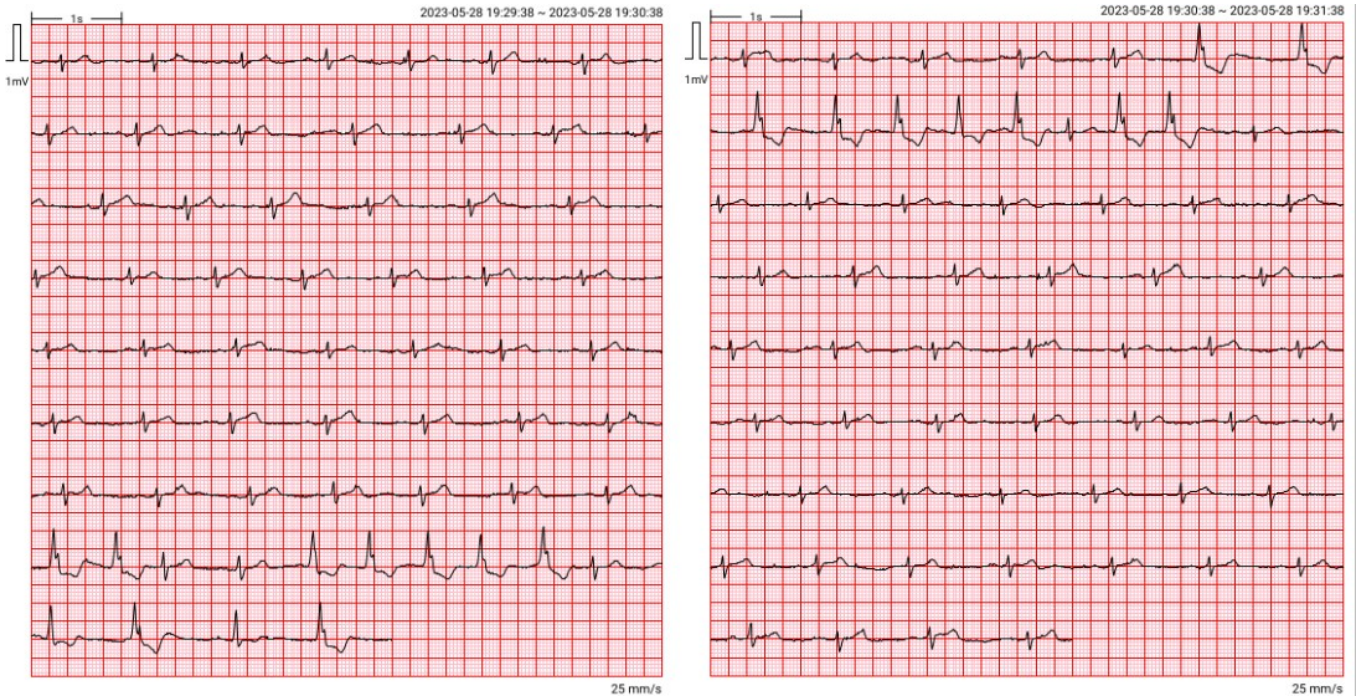

Figura 2. Ritmo idioventricolare intermittente rilevato dal monitoraggio ECG ambulatoriale (28 maggio 2023)

Dal 2021 al 2024, ha effettuato più di 35 visite al pronto soccorso e 30 visite cardiologiche (stime prudenti), principalmente per dolori al petto, respiro affannoso, vertigini o palpitazioni. Durante questo intervallo, è stato sottoposto a oltre 40 emocromi completi (CBC), oltre 40 pannelli metabolici completi **(CMP),** oltre 40 misurazioni della troponina e 13 misurazioni del peptide natriuretico di tipo B (BNP), che sono state documentate come costantemente entro i valori di riferimento, ad eccezione di un basso gap anionico. Le diagnosi di dimissione dal pronto soccorso più frequenti durante questo periodo sono state dolore toracico atipico e ansia.

Il 9 aprile 2024 (circa due anni e mezzo dopo la comparsa dei sintomi), il reparto di cardiologia ha prescritto una risonanza magnetica cardiaca, che ha rilevato la presenza di infiammazione e lievi cicatrici compatibili con la miocardite indotta dal vaccino COVID-19 **(Figura 3).** Questa diagnosi è stata poi confermata da un cardiologo. Il profilo genetico completo per aritmie e cardiomiopatie è risultato negativo. Dopo la diagnosi di miocardite, la valutazione si è spostata verso l'identificazione di un'eziologia unificante.

Figura 3. Risonanza magnetica cardiaca che mostra un'infiammazione miocardica compatibile con una miocardite indotta dal vaccino. Immagine assiale di risonanza magnetica cardiaca (RM) pesata in Tl con enhancement tardivo del gadolinio (LGE), datata 9 aprile 2024, che mostra iperintensità del segnale subepicardico e miocardico medio nella parete laterale del ventricolo sinistro, risultati compatibili con miocardite. Questo pattern radiologico è caratteristico dell'infiammazione miocardica non ischemica.

Nello stesso periodo, i sintomi si sono estesi oltre i disturbi cardiopolmonari e sono stati valutati in più sistemi organici; in diversi ambiti, i sintomi hanno preceduto le diagnosi formali e sono stati valutati ripetutamente nel tempo. I risultati principali sono riassunti di seguito per sistema organico.

Gastroenterologia

Sintomi e valutazione gastrointestinale iniziale

La valutazione gastroenterologica del 1° agosto 2022 ha documentato raucedine/gola secca, dolore addominale, dolore toracico, gonfiore, eruttazioni, gas e alterazioni delle abitudini intestinali.

Motilità dell'esofago superiore e della parte superiore dell'intestino

L'endoscopia superiore eseguita il 17 ottobre 2022 ha evidenziato una linea Z irregolare a 40 cm dagli incisivi, un lieve eritema gastrico diffuso e un'ernia iatale scorrevole di 2 cm. Il 17 maggio 2023, una nuova endoscopia superiore non ha evidenziato ernia iatale, una linea Z irregolare, valvola di Hill di grado II, esofagite e gastrite, con duodeno e digiuno normali. L'esofagogramma ha evidenziato stasi di contrasto (non è stato eseguito uno studio in fase solida). La manometria ad alta risoluzione ha evidenziato una motilità esofagea inefficace al 100% (60% di deglutizioni fallite, 40% di deglutizioni deboli

). Il monitoraggio del pH BRAVO è risultato incompleto a causa del distacco della sonda il secondo giorno. Le biopsie esofagee e duodenali sono risultate negative durante queste valutazioni. Si è notato un peggioramento dei sintomi riferiti con l'alimentazione e l'esercizio fisico, con sintomi primari quali fastidio/dolore toracico, difficoltà a respirare profondamente e dolore sottocostale sinistro.

Disbiosi e microbioma

Il paziente riferiva gonfiore, costipazione, eruttazioni e dolore addominale. Il test iniziale del respiro per la proliferazione batterica nell'intestino tenue (SIBO) effettuato nel luglio 2023 utilizzando un protocollo TrioSmart a base di lattulosio ha evidenziato un aumento dell'idrogeno di 20 ppm in 100 minuti, compatibile con la SIBO. Ripetuti test TrioSmart effettuati nel corso del 2024 dopo aver tentato diverse terapie hanno evidenziato un aumento persistente (mancata risposta). Il test IBS-Smart del 9 ottobre 2023 ha dimostrato che gli anticorpi anti-CdtB e anti-vinculina non erano elevati. Il paziente ha riferito una mancanza di risposta alla rifaximina e alla dieta elementare e ha interrotto la somministrazione di rifaximina/neomicina a causa del peggioramento dell'acufene e della perdita dell'udito neurosensoriale; è stato utilizzato motegrity per sostenere la motilità. In particolare, i modelli di test del respiro con predominanza di idrogeno sono più comunemente associati a manifestazioni con predominanza di diarrea, mentre il modello intestinale predominante di questo paziente era la stitichezza.
Durante questo periodo è stata documentata una concomitante dismotilità esofagea nel contesto di sintomi gastrointestinali persistenti.

Nel 2024 sono state eseguite due analisi delle feci. Una ha riportato la perdita della normale flora enterica. Nel febbraio 2024, un'analisi completa delle feci ha dimostrato un aumento della famiglia dei Bacteroides con una diminuzione dei Bifidobacterium, un aumento delle IgA secretorie (326 mg/dL; intervallo di riferimento 30-275) e anomalie degli acidi grassi a catena corta (diminuzione della percentuale di acetato, aumento della percentuale di butirrato e aumento della percentuale di valerato). L'aumento dei batteri del genere Bacteroides con riduzione dei batteri del genere Bifidobacterium è stato descritto da Hazan et al. in seguito alla vaccinazione con mRNA COVID-19 [9].

GB inferiore e sorveglianza colonscopica

La colonscopia iniziale del paziente, eseguita il 17 ottobre 2022, ha evidenziato diverticolosi e polipi multipli del colon (un polipo cecale di 15 mm e nove polipi di 4-8 mm nel colon trasverso/ascendente). In particolare, una colonscopia di controllo a 6 mesi, eseguita il 12 aprile 2023, ha evidenziato diverticolosi (colon sigmoideo e discendente) e polipi (un polipo sessile di 6 mm nel colon ascendente e otto polipi sessili di piccole dimensioni nel colon sigmoideo, discendente, trasverso e nel cieco). Gli intervalli di sorveglianza sono stati successivamente adeguati a 1 anno dopo la colonscopia dell'aprile 2023; una colonscopia del 2024 è risultata negativa, dopodiché il follow-up è stato esteso a 1,5 anni. Nel corso di queste valutazioni, tutti i polipi sono stati asportati e le biopsie sono risultate negative. Sono stati effettuati test genetici (Invitae Adenomatous Polyposis Panel e Invitae Multi-Cancer testing con analisi dell'RNA), ma non sono state identificate varianti patogene.

Enzimi pancreatici e capsula endoscopica

L'endoscopia capsulare eseguita il 28 febbraio 2024 ha evidenziato piccole angioectasie sparse non sanguinanti senza emorragia attiva. Da ottobre 2023 a ottobre 2025 sono state documentate anomalie ricorrenti degli enzimi pancreatici (innalzamenti seriali dell'amilasi/lipasi, compreso il test degli isoenzimi del 25 settembre 2025); il test degli isoenzimi ha confermato l'origine pancreatica. La pancreatite cronica è stata indicata come diagnosi provvisoria ed è stata programmata un'ecografia endoscopica.

Da notare che il paziente ha perso 50 libbre dal 04/2022 al 04/2024 (il 21% del peso corporeo) e non assumeva farmaci dimagranti.

Otorinolaringoiatria / Laringologia

La valutazione otorinolaringoiatrica del 22/03/2022 ha documentato un peggioramento dell'acufene e i test audiologici hanno evidenziato una perdita dell'udito alle alte frequenze, con perdita uditiva neurosensoriale bilaterale asimmetrica e più grave nell'orecchio destro (da moderata a grave a destra; da lieve a moderata a sinistra). Tra la primavera del 2022 e l'autunno del 2025, la cartella clinica documenta almeno sei test audiologici (conteggio conservativo), con un peggioramento iniziale seguito da una successiva stabilizzazione, e l'ultimo test effettuato nell'autunno del 2025.

Valutazioni multiple a partire dall'agosto 2022 hanno documentato laringospasmo, reflusso senza esofagite e disfagia orofaringea, con ulteriore documentazione di infiammazione delle corde vocali e disfonia vocale. Una valutazione laringologica effettuata il 02/06/2024 (videostroboscopia) ha documentato un'atrofia delle corde vocali da lieve a moderata.

Sono stati documentati episodi intermittenti di vertigini nell'ambito dell'anamnesi dei sintomi otorinolaringoiatrici. La vertigine parossistica posizionale benigna (BPPV) è stata documentata nelle cartelle cliniche neurologiche (2022-2024).

Neurologia e imaging strutturale

Una visita neurologica effettuata il 18/04/2022 ha documentato cefalea, problemi di udito, vertigini, confusione, parestesie, debolezza e disturbi del sonno. I sintomi sono stati successivamente descritti come progressivi, senza una chiara eziologia.

Nel 06/2023 è stato documentato un rinvio alla neurologia accademica per sintomi neurologici multipli di eziologia non chiara; l'EMG/NCS con stimolazione nervosa ripetitiva (29/06/2023) era normale. Tra il 2022 e il 2024, la documentazione neurologica includeva tre episodi di BPPV.

Nel febbraio 2025, la documentazione descriveva un episodio di piede cadente destro indolore (impressione del pronto soccorso: lesione del nervo peroneale vs radicolopatia L5) e successivamente intorpidimento del gomito destro; l'esame era descritto come inconcludente e sono stati richiesti ulteriori accertamenti.

risultato negativo per miastenia grave e arterite a cellule giganti. Al follow-up, l'anamnesi intervallata ha documentato vertigini/squilibrio persistenti, tinnito, sintomi autonomici, diplopia/disturbi visivi, disfagia, annebbiamento cognitivo, affaticamento, ipotensione, intolleranza alla temperatura, intolleranza all'esercizio fisico e progressiva tensione/dolore al lato sinistro; l'esame neurologico era non focale. Il 24/04/2025, una biopsia con punch nervoso ha confermato la diagnosi clinica di neuropatia delle piccole fibre e mialgia.

Imaging strutturale (10/2023-02/2025): Gli studi MRI hanno riportato una malattia degenerativa del disco a più livelli (cervicale/toracica/lombare) con restringimento moderato-grave del canale a C5-C6, emangiomi vertebrali ossei (T1/T3 -£ T4), perdita bilaterale della cartilagine dell'anca e lieve tendinosi del tendine del ginocchio sinistro; la MRI della spalla ha riportato una tendinopatia della cuffia dei rotatori con lesione quasi completa del sovraspinato.

Le valutazioni ortopediche, neurologiche, neuromuscolari e neurochirurgiche hanno documentato l'assenza di lesioni focali, mentre l'EMG/NCS è risultato normale.

Dermatologia

La documentazione dermatologica descriveva papule facciali di colore giallo-arancio con telangiectasia il 30/08/2021, che si sono risolte nell'autunno 2021. L'8/11/2022 è stata documentata un'eruzione cutanea sul tronco. Tra il 2022 e il 2025, la cartella clinica riporta diverse visite per eruzioni cutanee in cui la condizione non è stata diagnosticata in modo definitivo e sono state tentate terapie topiche. Una biopsia cutanea con punch eseguita il 14/04/2025 (addome laterale sinistro) ha riportato una patologia compatibile con dermatosi acantolitica transitoria (malattia di Grover) **(Figura 4).**

Figura 4. Malattia di Grover (dermatosi acantolitica transitoria) a seguito della vaccinazione con mRNA contro il COVID-19. Fotografia clinica scattata nel marzo 2022 che mostra papule eritematose sparse e lesioni crostose sulla parte superiore del torace, compatibili con la malattia di Grover**.**

(dermatosi acantolitica transitoria). La diagnosi è stata confermata dall'esame dermatopatologico. I sintomi sono comparsi poche settimane dopo la somministrazione della terza dose del vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA e sono stati accompagnati da segni infiammatori sistemici, tra cui miocardite e disfunzione gastrointestinale. Le biopsie cutanee seriali dalla pelle del tronco clinicamente colpita (tutte ottenute da aree che presentavano lesioni attive della malattia di Grover) più di tre anni dopo la vaccinazione hanno dimostrato la persistenza della proteina spike mediante immunoistochimica, con assenza della proteina nucleocapside SARS-CoV-2 in tutti i campioni. La biopsia a 1.364 giorni ha inoltre dimostrato la presenza di frammenti del gene spike (S1-S3) rilevabili mediante PCR, sequenze di origine della replicazione (oril/ori2) e sequenze potenziatrici SV40 nel DNA tissutale estratto, con conferma mediante sequenziamento Sanger dei frammenti di origine della replicazione.

Urologia

Il 22/03/2022 è stata diagnosticata una prostatite con ematospermia. Tra il 2022 e il 2025, diversi test del PSA e diverse analisi delle urine hanno dato esito negativo.

Oftalmologia

I sintomi visivi sono stati valutati a partire dal 04/05/2022, con documentazione di fluttuazioni della vista e cefalea (sintomi segnalati come iniziati 2 mesi prima), insieme a secchezza e diminuzione della vista. Le impressioni includevano secchezza oculare bilaterale, cicatrici maculari (OS; post-infiammatorie/traumatiche), ipopigmentazione **dell'RPE** e neoplasia coroidale benigna (OD). Il 06/07/2022, la documentazione di follow-up includeva un peggioramento delle fluttuazioni della vista (L>R) con diplopia orizzontale intermittente, vertigini e fotofobia, con una valutazione che documentava una sospetta foria scompensata e un peggioramento dell'occhio secco. Sono stati segnalati problemi di visione notturna.

Una visita oftalmologica nel maggio 2024 ha evidenziato dolore all'occhio sinistro e visione descritta come "spenta", con risultati dell'esame che documentavano emorragie retiniche bilaterali (superiori; in via di risoluzione), occhio secco e blefarite. Nell'aprile 2025 è stata diagnosticata esotropia con insufficienza di divergenza.

Psichiatria / Salute mentale

Il trattamento psichiatrico è iniziato il 02/09/2022 per sintomi di ansia descritti come atipici per carattere e intensità. Una prova con escitalopram (metà maggio 2022) è stata associata a tachicardia e tremori incontrollati ed è stata valutata durante una visita di emergenza come possibile sindrome serotoninergica. Le successive prove con un SSRI e un SNRI sono state associate a un peggioramento dei sintomi, così come gli interventi non farmacologici, tra cui la CBT e la TMS. Tra il 07/2023 e il 10/2023, ha partecipato a un programma di ricovero parziale seguito da un programma ambulatoriale step-down; l'obiettivo era la gestione dell'ansia come diagnosi primaria in quel momento. I sintomi non sono migliorati. È stato effettuato un test farmacogenomico (GeneSightB) per guidare la scelta dei farmaci; un successivo trattamento con desvenlafaxina è stato mal tollerato.

Il paziente è stato sottoposto a test neuropsichiatrici sui biomarcatori dell'espressione genica nel gennaio 2024 (MindX OneT^ Blood Test, MindX Sciences) e a un test sui biomarcatori immunitari/infiammatori basato sul sangue, di cui si parlerà più avanti (ITI-PEST™, Neo7 Biosciences; rapporto datato 10 settembre 2025). NR3C1, GLUD1 e TREM2 sono stati segnalati in entrambi i referti nonostante le diverse piattaforme analitiche e metodologie di valutazione. NR3C1 codifica il recettore dei glucocorticoidi, GLUD1 codifica la glutammato deidrogenasi mitocondriale e TREM2 codifica un recettore immunitario innato espresso sulle cellule della linea mieloide. La ricorrenza di questi geni in due test indipendenti indica una sovrapposizione a livello dei risultati dei biomarcatori riportati.

Il test dei biomarcatori di espressione genica MindX OneT* (30/01/2024) ha individuato un insieme di geni le cui funzioni accertate abbracciano ampi gruppi, tra cui proteine associate al sistema immunitario, proteine mitocondriali/metaboliche, regolatori della trascrizione/cromatina, proteine associate al citoscheletro e ai neuroni, proteine di trasporto vescicolare/endosomiale e proteine di risposta allo stress cellulare/omeostasi proteica.

Malattie infettive

La reattività sierologica a determinati patogeni trasmessi dalle zecche è stata identificata dal test IGeneX (07/05/2025); tuttavia, i successivi test PCR per *Babesia* e *Bartonella* sono risultati negativi (15/08/2025). Questi risultati sono stati interpretati con cautela come reattività sierologica piuttosto che come prova di infezione trasmessa dalle zecche. I test IgeneX Lyme Panel, AcuDart e Lyme PCR non hanno dato risultati reattivi.

Medicina vascolare

Il 9 maggio 2024, l'ecografia venosa duplex dell'arto inferiore sinistro ha evidenziato un lieve reflusso venoso (>500 ms) nelle vene femorale comune sinistra, femorale e grande safena con varicosità associate originate dalla grande safena e nessuna evidenza di TVP acuta o cronica. La disfunzione autonomica e l'infiammazione sistemica potrebbero contribuire al ristagno venoso e al carico sintomatico; tuttavia, lo studio duplex documenta il reflusso venoso come anomalia primaria.

Ambito della valutazione diagnostica

Nel corso della malattia, il paziente è stato sottoposto a valutazioni diagnostiche approfondite e ripetute in diverse specialità. Ciò ha comportato oltre 40 visite al pronto soccorso e più di 200 visite ambulatoriali in diverse specialità. Queste cifre sottostimano la portata totale delle cure, poiché non sono state incluse le visite di medicina generale, la fisioterapia e altre cure di supporto. Sebbene il numero di visite possa sembrare eccessivo, esso non riflette la frequenza o la gravità dei sintomi, né i numerosi casi in cui il paziente ha deciso di non ricorrere alle cure a causa delle ripetute valutazioni non diagnostiche e della percezione di una mancanza di benefici. Il numero totale di visite per specialità è indicato tra parentesi.

Le cure specialistiche includevano cardiologia (oltre 40), pronto soccorso (oltre 40), pneumologia (14), neurologia (16), gastroenterologia (24), epatologia (2), immunologia (5), reumatologia (2), malattie infettive (2), endocrinologia (4), ematologia (7), otorinolaringoiatria (19), oftalmologia (12), psichiatria (24), medicina ortopedica/medicina fisica e riabilitazione (20+), urologia (4), nefrologia (3), medicina bariatrica (1), chirurgia multispecialistica/generale (2) e medicina vascolare (2).

Valutazione di laboratorio e diagnostica per immagini

In modo conservativo, ciò includeva oltre 100 esami di laboratorio non di routine che coprivano le categorie autoimmuni/reumatologiche (28), malattie infettive (22), endocrine/metaboliche (18), ematologiche/coagulazione (10), genetiche (6) e molteplici esami gastrointestinali e infiammatori. Sono stati effettuati test longitudinali tra le diverse istituzioni per valutare la persistenza, la progressione o la risoluzione dei risultati; i test ripetuti non sono stati conteggiati come indagini separate. Gli unici esami di laboratorio costantemente anomali erano un basso gap anionico e un basso livello di testosterone libero con testosterone totale normale (la globulina legante gli ormoni sessuali era normale).

Parallelamente, il paziente è stato sottoposto a oltre 100 esami diagnostici per immagini e funzionali a livello cardiovascolare, polmonare, neurologico, oftalmico, endocrino, gastrointestinale, muscolo-scheletrico e vascolare. Ciò ha incluso tomografie computerizzate seriali della testa, del torace e dell'addome; studi Doppler e altri studi ecografici; risonanza magnetica cardiaca e non cardiaca; ecocardiografia transtoracica e da sforzo; monitoraggio ambulatoriale del ritmo cardiaco; scansione di ventilazione-perfusione; test di funzionalità polmonare; studi fluoroscopici e di motilità; imaging endoscopico; valutazione del calcio coronarico e valutazioni funzionali basate su tecniche nucleari; e ripetute valutazioni radiografiche.

Nel corso della valutazione, sono stati sistematicamente valutati ed esclusi meccanismi eziologici alternativi nei settori infettivo, autoimmune, reumatologico, genetico, ematologico, endocrino, maligno, tossico/correlato ai farmaci, cardiovascolare/vascolare, metabolico e neurologico primario. Questo processo diagnostico differenziale completo fornisce un quadro rigoroso per l'interpretazione dei risultati presentati in questo rapporto.

Stato degli anticorpi nucleocapsidici e persistenza degli anticorpi spike

A seguito della diagnosi di miocardite, la valutazione si è orientata verso un'eziologia unificante; uno degli aspetti principali era la valutazione di una precedente infezione da SARS-CoV-2 e la considerazione della miocardite nel contesto del Long COVID. Il paziente non ha una storia documentata di infezione da SARS-CoV-2 ed è rimasto negativo agli anticorpi nucleocapsidici fino a settembre 2025. La valutazione di una precedente infezione da SARS-CoV-2 e della risposta immunitaria umorale è stata effettuata utilizzando test seriali sugli anticorpi nucleocapsidici e spike in diversi laboratori e in diversi momenti. L'8 maggio 2024, 809 giorni dopo l'ultima vaccinazione COVID-19 del paziente, gli anticorpi nucleocapsidici erano negativi, mentre gli anticorpi spike erano superiori al limite massimo di rilevabilità del test (>250 U/mL). Il paziente ha richiesto ulteriori test per quantificare meglio i livelli di anticorpi spike e confermare il risultato iniziale relativo al nucleocapside.

Il 13 giugno 2024 (845 giorni dopo la vaccinazione), ripetendo il test è risultata negativa la presenza di anticorpi nucleocapsidici, con livelli elevati di anticorpi spike pari a 5.579 U/mL. Gli anticorpi nucleocapsidici sono rimasti nuovamente negativi, con livelli elevati di anticorpi spike pari a 5.136 U/mL il 23 dicembre 2024 (1.038 giorni dopo la vaccinazione). Il 25 settembre 2025 (1.314 giorni dopo la vaccinazione), gli anticorpi nucleocapsidici sono rimasti negativi presso Labcorp, mentre i livelli di anticorpi spike sono rimasti a 4.130 U/mL. Il test anticorpale più recente, effettuato il 23 gennaio 2026 (1.433 giorni dopo la vaccinazione), ha nuovamente dimostrato la negatività degli anticorpi nucleocapsidici, con livelli di anticorpi spike persistentemente elevati pari a 4.553 U/mL.

In queste misurazioni seriali, gli anticorpi nucleocapsidici non erano rilevabili in cinque momenti distinti compresi tra 809 e 1.433 giorni dopo la vaccinazione in tre laboratori indipendenti, mentre i livelli di anticorpi spike sono rimasti costantemente elevati per più di tre anni dopo l'ultima vaccinazione COVID-19 del paziente, in assenza di prove sierologiche di una precedente infezione da SARS-CoV-2.
L'interpretazione dei risultati relativi agli anticorpi nucleocapsidici e spike SARS-CoV-2 si è basata sulle linee guida del CDC per i test anticorpali. [10]

Anomalie delle citochine e traffico S1

Il 20 giugno 2024 (852 giorni dopo la vaccinazione), Radiance Diagnostics (certificato CLIA), utilizzando il pannello IncellDx Long Hauler Cytokine-14 e il pannello COVID-19 Sl Immune Subset, ha identificato monociti positivi alla proteina spike, tra cui CD I4LO elevato, CDI6+S1

monociti non classici positivi a 3,36 (intervallo di riferimento: 0,00) e monociti classici CD14++, CD16-+S1 positivi a 0,77 (intervallo di riferimento: 0,00), dimostrando un'espressione anomala della proteina spike in più sottogruppi di monociti. Il profilo delle citochine concomitante ha rivelato anomalie nella segnalazione immunitaria, con aumenti dell'interleuchina-4 (IL-4) a 14,2 (intervallo di riferimento: 2,3-6,2), dell'interleuchina-13 (IL-13) a 13,7 (intervallo di riferimento: 1,5-6,1), interleuchina-10 (IL-10) a 4,5 (intervallo di riferimento: 0,7-1,2), interferone-gamma (IFN-y) a 27,8 (intervallo di riferimento: 1,8-3,5) e fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) a 14,2 (intervallo di riferimento: 2,0-12,3). L'indice composito Long Hauler era elevato a 1,96 (intervallo di riferimento: ñ0,70). Ulteriori anomalie includevano una riduzione del fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi (GM-CSF) a 3,6 (intervallo di riferimento: 5,8-77,0) e una riduzione del CCL3 (MIP-I n) a 2,2 (intervallo di riferimento: 3,5-33,0), mentre il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-o) e il ligando CD40 solubile (sCD40L) sono rimasti entro gli intervalli di riferimento.

I test effettuati il 5 dicembre 2024 (1.038 giorni dopo la vaccinazione) hanno mostrato un aumento continuo delle citochine, tra cui IFN-y (17,0), IL-10 (3,3), IL-13 (12,1) e IL-4 (15,6), un miglioramento dell'indice Long Hauler (0,25), l'assenza di monociti S1-positivi rilevabili in tutti i sottogruppi e la normalizzazione del VEGF (10,6). Diversi marcatori immunitari sono rimasti soppressi o bassi, tra cui GM-CSF (2,4), CCL3 (MIP-lo) (2,2), interleuchina-6 (IL-6) (0,5) e interleuchina-8 (IL-8) (3,3). Nonostante il miglioramento di alcuni marcatori, i test longitudinali hanno continuato a dimostrare anomalie immunitarie persistenti nei domini delle citochine e cellulari, in linea con la disregolazione immunitaria.

Recenti test effettuati il 12 novembre 2025 (1.362 giorni dopo la vaccinazione) hanno rilevato livelli ridotti di IL-2 (1,1 pg/mL; riferimento 1,6-7,0), IL-6 (1,2 pg/mL; riferimento 1,4-3,0), IL-8 (3,3 pg/mL; riferimento 5,4-21,0), GM-CSF (3,6 pg/mL; riferimento 5,8-77,0), CCL3 (MIP-lii) (2,2 pg/mL; riferimento **3,5-33,0)** e TNF-o (1,2 pg/mL; riferimento 3,7-11,0), insieme ad aumenti di IL-4 (24,9 pg/mL; riferimento 2,3—d.2), IL-10 (2,7 pg/mL; riferimento 0,7-1,2), IL-13 (9,2 pg/mL; riferimento 1,5-6,1), IFN-y (15,0 pg/mL; riferimento 1,8—3,5), VEGF (15,4 pg/mL; riferimento 2,0—12,3) e CCL5 (RANTES) (12.361,3 pg/mL; riferimento 7,2-11.800), con un indice Long Hauler elevato di 1,10 (riferimento ñ0,70), che suggerisce un modello bidirezionale persistente di disregolazione immunitaria piuttosto che un'iperinfiammazione uniforme.

Proteina spike circolante persistente e anticorpi IgG4 specifici per la proteina spike

Due campioni di sangue prelevati a 1.173 e 1.284 giorni dopo la vaccinazione, dopo l'ultima dose di vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA, hanno mostrato anomalie persistenti nei profili dell'antigene spike e degli anticorpi **(Figura 5, pannello a).** Il test ELISA quantitativo ha identificato la proteina spike libera del SARS-CoV-2 nel plasma a 129,0 + 4,1 fg/mL a 1.173 giorni dopo la vaccinazione, accompagnata da un aumento significativo delle IgG4 specifiche per la proteina spike (354,4 22,4 ng/mL). La proteina spike era contemporaneamente rilevabile negli esosomi derivati dal plasma (11,6 0,1 fg/mL) in questo momento. A 1.284 giorni dalla vaccinazione, la proteina spike non era più rilevabile né nel plasma né negli esosomi; tuttavia, l'IgG4 rimaneva significativamente elevata a 320,2 4,4 ng/mL, suggerendo una stimolazione antigenica in corso anche dopo che i livelli di antigene erano scesi al di sotto della soglia di rilevabilità del test. La proteina spike non è stata rilevata nei lisati proteici PBMC in nessuno dei due momenti.

Rilevazione dell'mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19 negli esosomi circolanti

Per determinare se la persistenza della proteina spike potesse essere attribuita all'espressione continua dell'mRNA residuo derivato dal vaccino, è stata eseguita una RT-PCR sull'RNA esosomiale e PBMC isolato a 1.284 giorni dalla vaccinazione. Su tre ampliconi indipendenti mirati all'ORF spike Pfizer/Modema (S1, S2, S3), gli esosomi hanno dimostrato un'amplificazione chiara e riproducibile delle sequenze di mRNA del vaccino, con bande dei pesi molecolari previsti sull'elettroforesi su gel di agarosio **(Figura 5, pannello b).** Questi risultati forniscono una prova molecolare diretta che l'mRNA derivato dal vaccino persiste all'interno degli esosomi circolanti per più di 1.284 giorni dopo la somministrazione del vaccino a mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19.

Al contrario, l'RNA derivato dalle PBMC non ha mostrato alcun mRNA spike rilevabile, suggerendo che il serbatoio a lungo termine post-somministrazione dell'mRNA del vaccino non sia intracellulare all'interno dei leucociti circolanti, ma localizzato invece nei compartimenti vescicolari extracellulari. Data la comprovata capacità degli esosomi di trasportare RNA funzionale alle cellule riceventi, questi dati identificano un veicolo biologicamente plausibile per la produzione prolungata e intermittente della proteina spike.

Persistenza del DNA plasmidico del vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 nelle PBMC

Analisi PCR parallele mirate agli elementi del DNA plasmidico utilizzati nella produzione del vaccino a mRNA Pfizer-BioNTech hanno rivelato la persistenza a lungo termine delle sequenze dell'origine della replicazione, ma non delle sequenze del DNA spike o dell'enhancer SV40, nei PBMC **(Figura 5, pannelli c-d).** Il DNA plasmidico citosolico isolato dai PBMC a 1.284 giorni dalla vaccinazione ha mostrato una chiara amplificazione degli elementi di origine della replicazione (oril e ori2), mentre i test PCR per il DNA spike (S1-S3) e l'enhancer SV40 sono risultati negativi in tutte le frazioni di PBMC.

La banda ori è stata asportata e confermata mediante sequenziamento Sanger, convalidando che il frammento di DNA rilevato corrisponde esattamente alla regione di origine della replicazione del backbone del plasmide del vaccino mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19. Nessun altro componente del plasmide è stato

confermati o rilevati nei PBMC. Gli esosomi hanno prodotto solo segnali deboli o assenti su tutti i target del DNA plasmidico, in linea con un'esportazione minima o assente del DNA plasmidico nelle vescicole extracellulari.

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano il rilevamento persistente di sequenze di DNA dell'origine di replicazione all'interno dei PBMC 1.284 giorni dopo la vaccinazione; tuttavia, la fonte biologica di questo segnale non può essere attribuita in modo definitivo. Sebbene il frammento ori corrisponda alla sequenza del plasmide del vaccino mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19, i PBMC sono in grado di internalizzare ed elaborare il DNA extracellulare, compreso il DNA batterico contenente motivi omologhi dell'origine di replicazione. Di conseguenza, il segnale ori potrebbe riflettere l'assorbimento intracellulare di frammenti di DNA simili all'origine della replicazione piuttosto che la persistenza del plasmide vaccinale intatto.

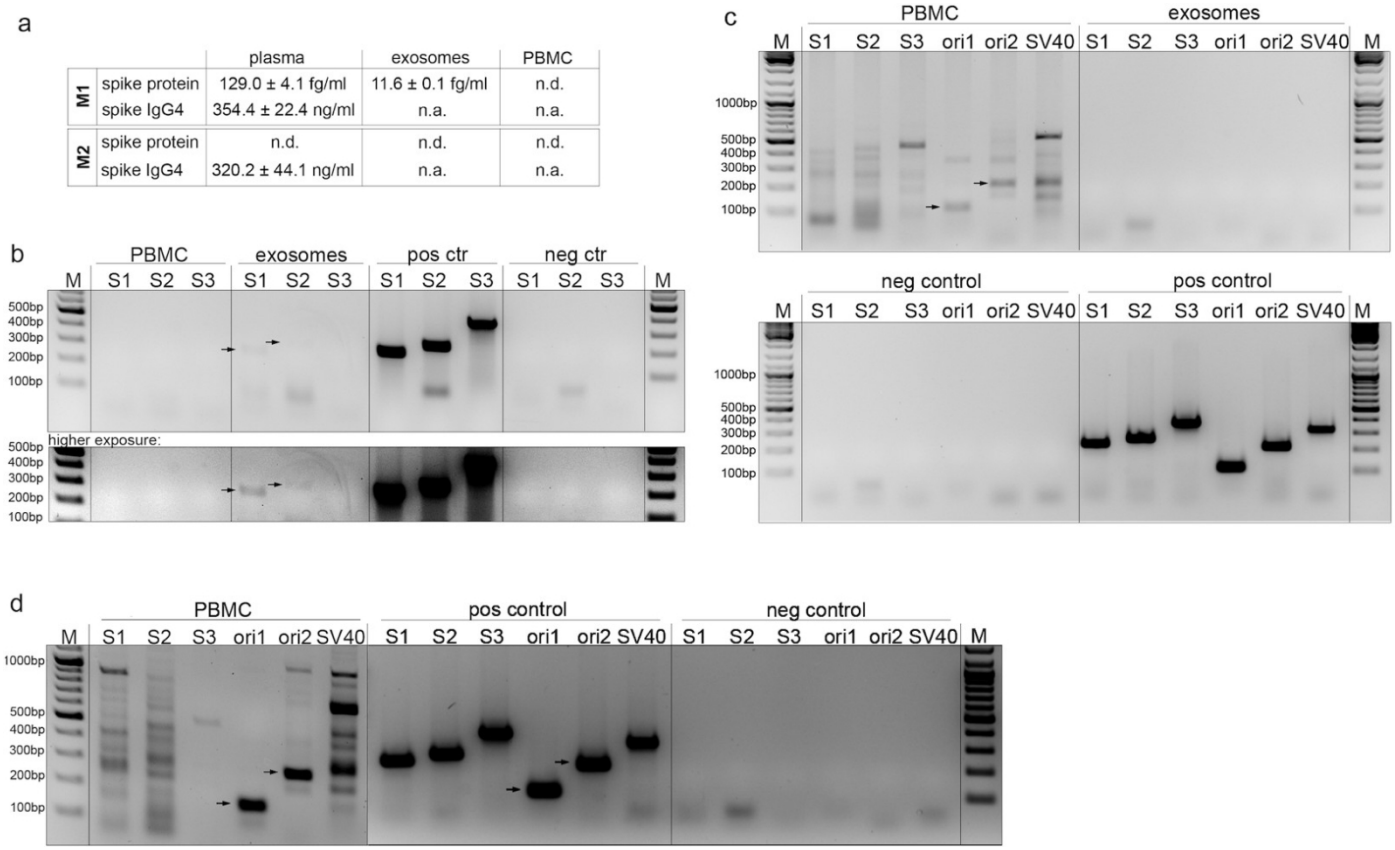

Figura S. **Rilevamento molecolare della proteina spike, dell'mRNA del vaccino e degli elementi del DNA plasmidico nel sangue periferico a 1.173-1.284 giorni dopo la vaccinazione**

a. I livelli di proteina spike e anticorpi IgG4 contro la proteina spike nel plasma, negli esosomi e nelle PBMC preparati da campioni di sangue EDTA sono stati misurati mediante ELISA quantitativo. La misurazione 1 è stata raccolta 1.173 giorni dopo l'ultima vaccinazione. La misurazione 2 è stata effettuata alcuni mesi dopo (1.284 giorni dopo la vaccinazione). I dati sono riportati come media + deviazione standard della media. n.d., non rilevato; n.a., non applicabile; IgG4, immunoglobulina G4.

b. Rilevazione qualitativa di tre sequenze indipendenti della proteina spike (SI-S3) dell'mRNA del vaccino mediante RT-PCR ed elettroforesi su gel di agarosio dell'RNA totale isolato ottenuto da PBMC ed esosomi di campioni di sangue EDTA prelevati 1.284 giorni dopo l'ultima vaccinazione. Carico per cDNA: 9 ng (PBMC) e 17 ng (esosomi). Le frecce indicano che le bande sono positive per la rispettiva sequenza di DNA.

c-d. Rilevamento qualitativo di diverse sequenze per la proteina spike, ori e potenziatore SV40 dei residui di DNA plasmidico del vaccino citosolico (c) o del DNA cellulare totale (d) dopo elettroforesi su gel di agarosio in PBMC ed esosomi ottenuti da campioni di sangue EDTA prelevati 1.284 giorni dopo l'ultima vaccinazione. Caricamento: 113 ng di DNA plasmidico (PBMC) e 125 ng di DNA totale **(PBMC)** e 1 ng di DNA plasmidico (esosomi). Non è stato possibile isolare quasi nessun DNA plasmidico dagli esosomi. Le frecce indicano le bande che rappresentano la sequenza di origine della replicazione, il cui DNA è stato tagliato dal gel, purificato e confermato mediante sequenziamento Sanger.

Ml, misurazione 1; M2, misurazione 2; S, proteina spike; ori, origine della replicazione; SV40, sequenza potenziatrice SV40; bp, coppie di basi; M, marcatore; pos ctr, controllo positivo (fiala di vaccino); neg ctr, controllo negativo (controllo senza modello); PBMC, cellule mononucleate del sangue periferico.

DNA **plasmidico persistente del vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 nel tessuto somatico**

Una biopsia cutanea ottenuta 1.364 giorni dopo la vaccinazione da un'area clinicamente affetta dalla malattia di Grover è stata sottoposta ad analisi dell'RNA e del DNA. La RT-PCR dell'RNA tissutale non ha rivelato alcun mRNA spike rilevabile, confermando che i trascritti derivati dal vaccino non erano presenti o erano al di sotto dei livelli di rilevabilità all'interno di questo campione somatico **(Figura 6,** pannello a).

Al contrario, la PCR eseguita sul DNA genomico estratto dalla stessa biopsia ha dimostrato una chiara rilevazione delle sequenze di DNA spike (S1-S3), entrambe origini di replicazione, e dell'enhancer SV40, in linea con la ritenzione duratura del DNA plasmidico del vaccino all'interno del tessuto somatico non immune (Figura 6, pannello b). Il paziente nega di essere stato esposto all'SV40 attraverso vie storiche o professionali riconosciute, tra cui la vaccinazione contro la poliomielite contaminata da SV40 (1955-1963), il contatto con laboratori o primati o la trasmissione secondaria documentata. Elementi di sequenze regolatorie derivate dall'SV40 sono stati utilizzati in costrutti di DNA plasmidico associati al modello di produzione del vaccino a mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19 (BNT162b2). Questi risultati forniscono prove molecolari dirette che le sequenze plasmidiche derivate dal vaccino si sono localizzate nel tessuto sottocutaneo e sono rimaste rilevabili per più di 1.364 giorni dopo la vaccinazione.

Prove istopatologiche e immunoistochimiche di deposito cronico della proteina Spike

L'esame istologico di biopsie cutanee seriali raccolte a 1.160, 1.249 e 1.364 giorni dopo la vaccinazione (tutte ottenute dalla cute del tronco in aree con lesioni clinicamente attive della malattia di Grover) ha rivelato alterazioni infiammatorie persistenti e in evoluzione. A 1.160 giorni dalla vaccinazione, il tessuto mostrava una lieve elastosi solare con infiltrati infiammatori perivascolari discreti **(Figura 6,** pannello c).
L'immunoistochimica ha identificato la proteina della subunità 1 della proteina spike del SARS-CoV-2 all'interno delle cellule endoteliali e dei macrofagi perivascolari, mentre la proteina nucleocapside era assente **(Figura 6, pannello** d), escludendo una precedente infezione da SARS-CoV-2 come fonte dell'antigene.

A 1.249 giorni dalla vaccinazione, il derma presentava una miscela di tessuto connettivo vascolare e strutture adipose con scarsi residui epidermici **(Figura 6,** pannello e). La proteina spike rimaneva rilevabile all'interno di macrofagi perivascolari sparsi **(Figura 6,** pannello f). A 1.364 giorni dalla vaccinazione, la biopsia ha evidenziato un'infiltrazione infiammatoria da moderata a pronunciata a livello perivascolare, periannessale e perineurale, composta da linfociti, macrofagi, mastociti ed eosinofili **(Figura 6, pannello g).**
L'immunoistochimica ha nuovamente identificato un deposito persistente di proteina spike, compresa l'espressione nelle fibre nervose e nei macrofagi perivascolari, con continua assenza di colorazione del nucleocapside **(Figura 6,** pannello h).

Questi risultati documentano un accumulo cronico e multisito della proteina spike nei compartimenti endoteliali, macrofagici e neurali che si estende per oltre 1.364 giorni dopo la vaccinazione, senza alcuna evidenza che l'antigene abbia avuto origine da un'infezione. **La tabella** 1 fornisce una sintesi integrata di questi risultati longitudinali.

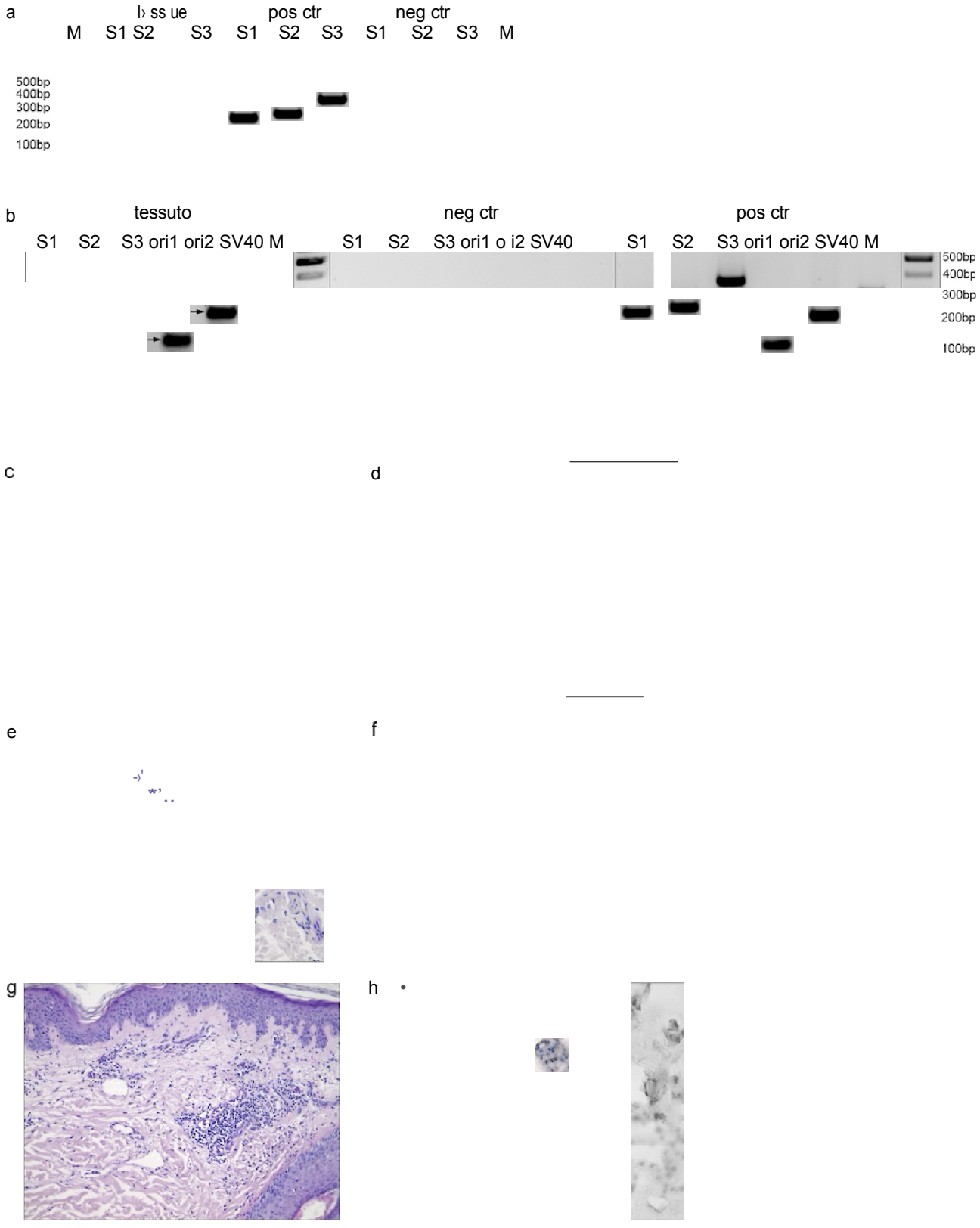

Figura 6. Rilevazione di DNA derivato dal vaccino e prove istopatologiche della persistenza della proteina spike in biopsie cutanee seriali del tronco ottenute da aree clinicamente attive della malattia di Grover (da 1.160 a 1.364 giorni dopo la vaccinazione).

a. Rilevamento qualitativo di tre sequenze indipendenti della proteina spike (S1-S3) dell'mRNA del vaccino mediante RT-PCR ed elettroforesi su gel di agarosio dell'RNA totale isolato ottenuto dalla biopsia cutanea effettuata 1.364 giorni dopo l'ultima vaccinazione. Carico per cDNA: 14 ng. Nessun mRNA della proteina spike è rilevabile nel tessuto.

b. Rilevamento qualitativo di diverse sequenze per la proteina spike, ori e potenziatore SV40 del DNA cellulare totale dopo elettroforesi su gel di agarosio in biopsia cutanea prelevata 1.364 giorni dopo l'ultima vaccinazione. Caricamento: 79 ng di DNA. Le frecce indicano le bande che rappresentano le diverse sequenze plasmidiche.

S, proteina spike; ori, origine della replicazione; SV40, sequenza potenziatrice SV40; bp, coppie di basi; M, marcatore; pos ctr, controllo positivo (fiala di vaccino); neg ctr, controllo negativo (controllo senza modello).

c—h. Tutte le biopsie tissutali sono state ottenute dalla cute del tronco in aree con lesioni clinicamente attive della malattia di Grover.

c-d. Tessuto cutaneo prelevato 1.160 giorni dopo l'ultima vaccinazione. (c) Il tessuto mostra lievi danni causati dal sole e una discreta infiltrazione infiammatoria perivascolare nel derma superiore. Colorazione H&E, ingrandimento 200x. (d) Sottounità spike 1 del SARS-CoV-2 rilevata nelle cellule endoteliali e nei macrofagi perivascolari. Nessun nucleocapside del SARS-CoV-2 rilevato (non mostrato). Immunoistochimica, proteina spike in marrone, ingrandimento 200x.

e-f. Tessuto cutaneo prelevato 1.249 giorni dopo l'ultima vaccinazione. (e) Il tessuto mostra tessuto connettivo vascolare e adiposo con solo pochi strati epidermici rimasti. È presente un danno solare moderato. Colorazione H&E, ingrandimento 200x. (f) La subunità 1 della proteina spike SARS-CoV-2 è stata rilevata in singoli macrofagi perivascolari. Non è stato rilevato il nucleocapside SARS-CoV-2 (non mostrato). Immunoistochimica, proteina spike in marrone, ingrandimento 200x.

g-h. Tessuto cutaneo prelevato 1.364 giorni dopo l'ultima vaccinazione. (g) La biopsia cutanea mostra un'epidermide leggermente ipercheratosica, un danno solare moderato e un infiltrato infiammatorio perivascolare, periadnexale e perineurale da moderato a pronunciato. Questo infiltrato è costituito da linfociti, macrofagi, mastociti e granulociti eosinofili. Colorazione H&E, ingrandimento 200x. (h) La subunità 1 della proteina spike del SARS-CoV-2 è stata rilevata in singoli macrofagi perivascolari e in alcune fibre nervose. Il nucleocapside del SARS-CoV-2 non è stato rilevato (non mostrato). Immunoistochimica, proteina spike in marrone, ingrandimento 200x.

Campione trascorsi Data	Giorni Ultimo Vaccino	Test / Evento	Risultati chiave
20/02/2022	N/A	Pfizer mRNA COVID-19 vaccino—eRichiamo	Dose di richiamo somministrata
05/08/2024	809 giorni	Nucleocapside e spike Anticorpi	Nucleocapside negativo; anticorpi spike >250 (superiore al limite massimo di rilevabilità del test)
13/06/2024	845 giorni	Anticorpi nucleocapside e spike	Nucleocapside negativo; anticorpi spike 5.579 U/mL (elevati)
20/06/2024	852 giorni	IncellDx Long Hauler e sottogruppo immunitario COVID-19 S1 Pannello	Rilevati monociti Sl-positivi (CD14loCD16+ non classici 3,36; CD14++CD16— classici 0,77); anomalie delle citochine; indice Long Hauler 1,96 (elevato)
05/12/2024	1.020 giorni	IncellDx Long Hauler & COVID-19 SI Sottoinsieme immunitario Pannello	Anomalie persistenti delle citochine; monociti Sl-positivi non più rilevati
23/12/2024	1.038 giorni	Anticorpi nucleocapside e spike	Nucleocapside negativo; anticorpi Spike 5.136 U/mL (elevati)
24/04/2025	1.160 giorni	Biopsia del tronco con lesione di Grover (PCR + istologia/IHC)	R'ub nelle cellule endoteliali; subunità Spike SI positiva nel perivascolare o età 2, u esc :1 rilevato
05/07/2025	1.173 giorni	Test su plasma/PBMC	Proteine Spike nel plasma 129,01 +/- fg/mL; Proteine Spike negli esosomi 11,65 +/-; IgG4 proteina Spike Ab 354,4 +/-
22/07/2025	1.249 giorni	Biopsia del tronco della lesione di Grover (istologia/IHC)	Sottounità Spike SI del SARS-CoV-2 positiva nei macrofagi perivascolari; nucleocapside non rilevata
19/08/2025	1.277 giorni	Analisi multi-omica	Instabilità genomica strutturale, stress redox e mitocondriale, attivazione endoteliale e firma proteomica di infiammazione cronica e danno vascolare.
26/08/2025	1.284 giorni	Test su plasma/PBMC	DNA plasmidico in PBMC positivo (ori 1, 2); mRNA del vaccino negli esosomi positivo (sequenza SI e S2 SPIKE); IgG4 proteina spike Ab 320,2 +/-
17/09/2025	1.306 giorni	Analisi proteomica delle urine	Snn n Firma proteomica infiammatoria coerente con l'attivazione immunitaria e la perdita vascolare t
25/09/2025	1.314 giorni	Anticorpi nucleocapside e spike	Nucleocapside negativo; anticorpi spike 4.130 U/mL (elevati)
11/12/2025	1.362 giorni	IncellDx Long Hauler & Pannello sottogruppi immunitari COVID-19 SI	Anomalie persistenti delle citochine; aumento del VEGF; indice Long Hauler 1,10 (elevato)
14/11/2025	1.364 giorni	Biopsia del tronco con lesione di Grover (PCR + istologia/IHC)	DNA plasmidico del vaccino positivo (SV40, ori 1, ori 2: tutti positivi); frammenti di DNA plasmidico del vaccino positivi (sequenza 1; sequenza 2; sequenza 3); subunità Spike SI SARS-CoV-2 positiva nelle fibre nervose; subunità Spike SI positiva nelle cellule endoteliali; subunità Spike SI positiva nei macrofagi perivascolari; nucleocapside non rilevata
23/01/2026	1.433 giorni	Anticorpi nucleocapside e spike	Nucleocapside negativo; anticorpi Spike 4.553 U/mL (elevati)

Tabella 1. Cronologia dei risultati di laboratorio integrati. I test effettuati in più momenti hanno identificato risultati correlati allo spike e componenti specifici del vaccino nel sangue e nei tessuti (compresi i test su plasma, esosomi e PBMC, nonché l'immunoistochimica dei tessuti), con rilevamenti concordanti da parte di più laboratori indipendenti (Inmodia e Radiance). Gli anticorpi nucleocapside sono risultati ripetutamente negativi in cinque test separati effettuati da tre laboratori indipendenti e la proteina nucleocapside non è stata rilevata in tre biopsie cutanee che hanno dimostrato il deposito della subunità spike S1.

Analisi **multi-omica**

Il 19 agosto 2025, 1.277 giorni dopo la vaccinazione, è stato prelevato DNA genomico dal sangue intero e l'analisi delle varianti strutturali (SV) ha identificato 27.172 eventi candidati, tra cui alterazioni simili a copie multiple e riarrangiamenti complessi compatibili con l'instabilità genomica. Una grande duplicazione sul cromosoma 7p (35,9-56,3 Mb) comprendeva il locus EGFR (SU 11). Ulteriori duplicazioni e delezioni multi-megabase sono state osservate in regioni contenenti MYC (8q24), ERBB2/HER2 (l7ql2) ed ETV6/RUNX1 (12p13/21q22). Una piccola delezione localizzata vicino all'EGFR (chr7:55.219-55.214 Mb) ha ulteriormente indicato l'instabilità in questa regione. Inoltre, il confronto tra RNA-seq e sequenziamento dell'intero genoma (WGS) abbinato ha rivelato varianti di codifica solo RNA nella traduzione/ribosoma (EIF2A, EIF3A, EIF5, RPS14, NOP56, RRP9, RRP12, FBL), sorveglianza dell'mRNA/NMD (UPF1, UPF2, SMG1), elaborazione di piccoli RNA (DICER1, AGO2, DGCR8), regolazione epigenetica (CHD4, HDAC1, DNMT1) e TP53.

La trascrittomica del sangue intero è stata analizzata mediante REViSS/aHI-PBIMA, che ha dimostrato una marcata disregolazione dei geni allineati con i domini sintomatici del paziente: GPX4 era sottoregolato (—2,2), indicando un controllo redox compromesso e stress mitocondriale; ACE era sovraregolato (+4,6), in linea con l'attivazione endoteliale e lo squilibrio RAAS; APC era marcatamente ridotto (—6,1), in linea con la rottura della barriera gastrointestinale e la disbiosi; e LMNA era diminuito (—3,7), suggerendo uno stress strutturale nucleare rilevante per la vulnerabilità dei cardiomiociti e dei neuroni. Il punteggio Hallmark ha mostrato una predominanza di segnali sfavorevoli negli assi vascolare, mitocondriale e gastrointestinale, in accordo con la miocardite del paziente, precedenti embolie polmonari, affaticamento cronico con

disautonomia, infiammazione dermatologica e sintomi intestinali. Questi risultati trascrittomici confermano le prove proteomiche contemporanee di infiammazione sistemica e supportano uno stato infiammatorio persistente associato a picchi.

Il 17 settembre 2025 è stata raccolta l'urina per un'analisi proteomica completa, al fine di valutare i modelli di escrezione proteica sistemica che riflettono l'infiammazione persistente e l'attivazione immunitaria. La spettrometria di massa quantitativa ha identificato un marcato aumento delle proteine legate alla segnalazione immunitaria innata (S100A8, S100A9, **CAMP),** al complemento e alla risposta di fase acuta (C3, CFH, SERPINA1), allo stress ossidativo e al danno endoteliale (PRDX1, APOE, HP, HPX) e alla regolazione adattativa degli anticorpi (IGHG1-4, IGHA1, B2M). Queste proteine, tipicamente non rilevabili o presenti solo in tracce nelle urine sane, indicano una sovrapproduzione sistemica e una perdita vascolare causata dall'infiammazione piuttosto che una disfunzione renale primaria. I set di dati proteomici completi sono presentati nelle **tabelle supplementari S1-S4.**

I test genetici hanno identificato la presenza di HLA-B*07:02 e HLA-DRB I*11:04, entrambi alleli associati a una maggiore reattività immunitaria [11]. HLA-B*07:02, un allele di classe I, è noto per influenzare fortemente le risposte delle cellule T CD8* agli antigeni virali e può presentare peptidi attraverso vie di elaborazione degli antigeni sia convenzionali che alternative, sostenendo potenzialmente la presentazione degli antigeni [12]. HLA-DRB1*11:04, un allele di classe II, è stato collegato a una maggiore sensibilità immunitaria e a una propensione alle risposte infiammatorie e autoimmuni [13]. La coesistenza di questi alleli può contribuire al profilo infiammatorio cronico del paziente e alla prolungata attivazione immunitaria osservata dopo la vaccinazione [14].

Trattamento mirato della patologia associata alla proteina Spike

I trattamenti principali hanno incluso maraviroc e atorvastatina (agosto 2024-marzo 2025) [7]; il protocollo McCullough "Base Spike Detoxification" (marzo 2025-in corso) [15]; colchicina; apixaban; e integratori nutraceutici. Dopo il trattamento con maraviroc e atorvastatina, il paziente ha mostrato una diminuzione dell'indice Radiance Diagnostics Long Hauler, un miglioramento del VEGF e l'assenza di S1 rilevabile nei monociti. Da quando è stato avviato il regime "Base Spike Detoxification" di McCullough, i livelli di anticorpi spike sono diminuiti e lo spike non è più rilevabile nel plasma. Nonostante questi miglioramenti, il paziente rimane sintomatico. Il paziente ha iniziato un'invalidità a lungo termine nel giugno 2023 e rimane incapace di lavorare.

Sebbene dopo il trattamento non siano stati più rilevati proteine spike circolanti e monociti Sl-positivi, gli anticorpi specifici per spike rimangono persistentemente elevati. Rimangono anche i marcatori di instabilità genomica e il rilevamento persistente di proteine spike, mRNA, DNA plasmidico e anomalie delle citochine, e il paziente rimane sintomatico. Queste osservazioni riflettono la risposta di un singolo paziente e sono necessari studi controllati per definire la rilevanza clinica dei componenti persistenti derivati dal vaccino e per determinare se interventi mirati possano modificare questi processi in modo sicuro e riproducibile. Sia gli anticorpi anti-spike totali che la sottoclasse IgG4 possono legarsi alla proteina spike e formare complessi immunitari che potrebbero non essere rilevati dai test convenzionali sugli antigeni liberi. Questo fenomeno di sequestro dei complessi immunitari e mascheramento degli epitopi può portare a una sottostima del carico antigenico totale e dovrebbe essere preso in considerazione quando si interpretano risultati bassi o non rilevabili della proteina spike in presenza di titoli anticorpali spike persistentemente elevati.

Discussione

Dopo oltre 100 indagini di laboratorio non di routine, oltre 100 studi di imaging e funzionali e l'esclusione sistematica di un ampio spettro di meccanismi eziologici alternativi in diversi ambiti clinici, questo caso dimostra la persistenza della proteina spike e delle sequenze di acido nucleico correlate al vaccino mRNA fino a 3,7 anni dopo l'ultima vaccinazione con il vaccino mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19. Valutazioni sierologiche seriali effettuate tra 809 e 1.433 giorni dopo la vaccinazione hanno mostrato cinque risultati negativi agli anticorpi nucleocapsidici in tre laboratori indipendenti, e la proteina nucleocapsidica era assente in tutti i campioni di tessuto positivi alla proteina spike, escludendo efficacemente una precedente infezione da SARS-CoV-2 come fonte della proteina spike e del materiale genetico rilevati. I risultati relativi al vaccino e alla proteina spike sono stati ottenuti in diversi laboratori indipendenti in più momenti utilizzando metodologie analitiche ortogonali, tra cui ELISA ad alta sensibilità, immunoistochimica automatizzata con correlazione istopatologica, RT-PCR, PCR standard con conferma mediante sequenziamento Sanger, sequenziamento dell'intero genoma, profilazione trascrittomica e spettrometria di massa quantitativa, su campioni biologici distinti comprendenti plasma, esosomi circolanti, cellule mononucleate del sangue periferico, urina e biopsie cutanee seriali del tronco. Il rilevamento convergente della proteina spike, delle sequenze di mRNA spike e degli elementi di DNA del backbone plasmidico su piattaforme indipendenti e compartimenti biologici supporta la riproducibilità e la coerenza interna di queste osservazioni. Questi risultati descrivono un grado di persistenza molecolare a lungo termine non segnalato in precedenza negli esseri umani dopo la vaccinazione con mRNA. La proteina spike è rimasta rilevabile nel plasma e negli esosomi a 1.173 giorni dalla vaccinazione, e l'immunoistochimica ha confermato la sua continua presenza all'interno delle cellule endoteliali, dei macrofagi perivascolari e delle fibre nervose in biopsie cutanee seriali fino a 1.364 giorni dopo la vaccinazione. Il rilevamento della proteina spike all'interno degli esosomi è particolarmente significativo, poiché il carico esosomiale è attivo e regolato.

processo cellulare, indicante una manipolazione o produzione intracellulare continua della proteina spike, piuttosto che una circolazione passiva dell'antigene residuo. Parallelamente, l'mRNA derivato dal vaccino, che si riteneva degradasse in poche ore o giorni, è stato chiaramente amplificato dagli esosomi circolanti a 1.284 giorni dalla vaccinazione, segnando la più lunga persistenza in vivo conosciuta di mRNA da qualsiasi piattaforma terapeutica o vaccinale. Poiché gli esosomi impacchettano selettivamente l'RNA attraverso percorsi cellulari definiti, la presenza di mRNA spike intatto in questo compartimento suggerisce un serbatoio biologicamente attivo in grado di consentire un'espressione prolungata e intermittente **della proteina** spike. A livello di DNA, le sequenze di origine della replicazione (oril e ori2) dal backbone del plasmide del vaccino mRNA Pfizer-BioNTech COVID-19 sono state rilevate all'interno dei PBMC a 1.284 giorni dalla vaccinazione, mentre il DNA spike e le sequenze potenziatrici SV40 erano assenti nel compartimento sanguigno. Tuttavia, poiché le PBMC internalizzano e processano regolarmente acidi nucleici extracellulari, compreso il DNA batterico contenente motivi omologhi di origine della replicazione, il segnale ori rilevato potrebbe riflettere l'assorbimento di frammenti di DNA simili all'origine della replicazione piuttosto che la persistenza di plasmidi vaccinali intatti o funzionali. Al contrario, la biopsia cutanea ha rivelato una più ampia persistenza di elementi di DNA plasmidico, compresi frammenti del gene spike, oril/ori2 e l'enhancer SV40. Questi risultati dimostrano direttamente che il materiale genetico correlato al vaccino può persistere a lungo termine sia nei tessuti immunitari che in quelli non immunitari, con diversi frammenti di plasmide che sopravvivono in diverse nicchie biologiche. La contaminazione da DNA nei vaccini COVID-19 è stata precedentemente documentata da diversi produttori, piattaforme e paesi, con livelli misurati che superano le soglie normative fino al 65.500% [16].

È importante sottolineare che questo profilo molecolare è in linea con il decorso clinico del paziente, che comprendeva embolia polmonare, miocardite confermata dalla risonanza magnetica cardiaca nonostante livelli normali di troponina e peptidi natriuretici, e una costellazione progressiva di sintomi multisistemici compatibili con la sindrome post-vaccinale. La presenza persistente della proteina spike nella circolazione e all'interno degli esosomi può contribuire alla continua attivazione endoteliale, alla disregolazione immunitaria e al danno microvascolare, meccanismi implicati nelle complicanze trombotiche e cardiache successive alla vaccinazione con mRNA [2]. Per contestualizzare le rilevazioni molecolari longitudinali insieme alle manifestazioni cliniche multisistemiche confermate del paziente, **la Figura** 7 fornisce una sintesi visiva integrata dei biomateriali persistenti derivati dal vaccino, della disregolazione genomica e del coinvolgimento degli organi e dei sistemi identificati fino a 3,7 anni dopo la vaccinazione.

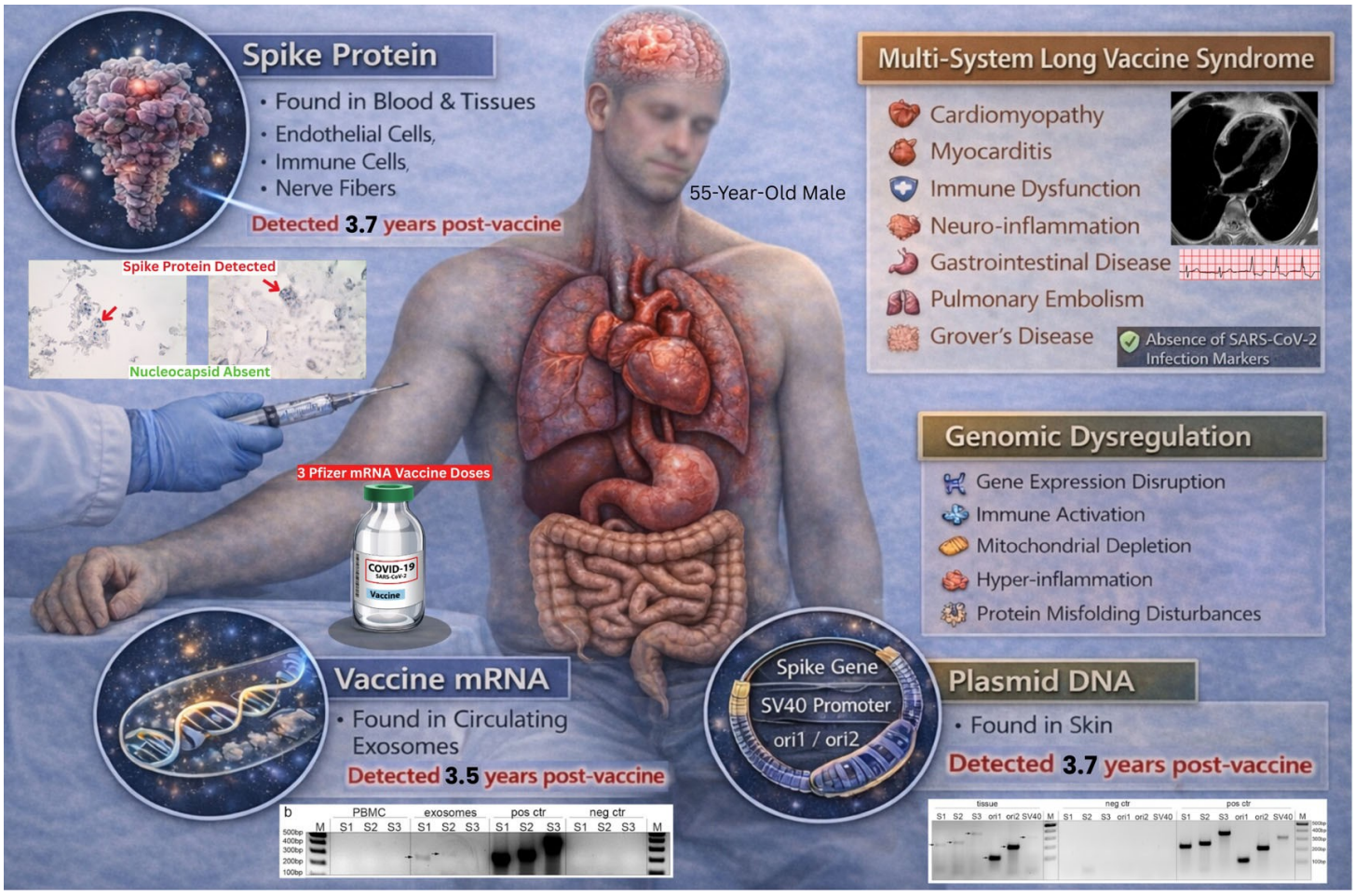

Figura 7. Persistenza molecolare integrata e risultati clinici multisistemici 3,7 anni dopo la vaccinazione con mRNA contro il COVID-19.

La presenza combinata di frammenti persistenti di DNA plasmidico, mRNA del vaccino esosomiale e proteina spike a lunga durata solleva importanti considerazioni meccanicistiche. Sebbene questo caso non dimostri l'integrazione genomica, la presenza prolungata di più componenti del vaccino mRNA all'interno delle cellule ospiti solleva la possibilità di persistenza extracromosomica o eventi di inserzione, soprattutto alla luce delle prove pubblicate che dimostrano la trascrizione inversa e l'incorporazione genomica di sequenze correlate al vaccino in vitro [17, 18] e in vivo [19]. Questi risultati sottolineano l'urgente necessità di una sorveglianza molecolare a lungo termine degli individui che presentano sintomi cronici dopo la vaccinazione con mRNA e richiedono una rivalutazione delle ipotesi relative alla farmacocinetica e al destino biologico dei componenti del vaccino mRNA.

Nel rapporto europeo di valutazione pubblica (EPAR; pagg. 4€r-47) su Comirnaty, l'EMA afferma che non sono stati condotti studi tradizionali di farmacocinetica o biodistribuzione con il vaccino candidato BNT162b2 e che la biodistribuzione è stata invece valutata in studi su roditori non GLP utilizzando formulazioni surrogate [20]. Il richiedente ha valutato un surrogato modRNA luciferasi formulato in un LNP utilizzando la bioluminescenza in vivo (IVIS) nei topi e una formulazione LNP-mRNA radiomarcata ([°H]) nei ratti, che è stata descritta come più sensibile e ha dimostrato un modello di biodistribuzione più ampio. Nei topi (3 femmine per gruppo), l'IVIS ha rilevato un segnale di luciferasi nei siti di iniezione e nella regione epatica (interpretato come drenaggio verso il fegato), con letture che si sono estese fino a 9 giorni. Nei ratti seguiti per 48 ore dopo una singola dose IM di 50 pg, la radioattività è stata rilevata nella maggior parte dei tessuti sin dal primo momento, con il sito di iniezione e il fegato come siti principali; al di fuori del sito di iniezione, il segnale recuperato era maggiore nel fegato (fino al 21,5% della dose iniettata) e sostanzialmente inferiore nella milza, nelle ghiandole surrenali e nelle ovaie. Poiché la radiomarcatura è più sensibile, è preferibile per la biodistribuzione e può rilevare una distribuzione tissutale di basso livello che l'imaging con reporter potrebbe non rilevare; di conseguenza, il risultato IVIS nei topi secondo cui il segnale nella regione epatica è tornato al livello di fondo entro 48 ore riflette la perdita dell'espressione rilevabile della luciferasi piuttosto che la clearance confermata del materiale associato all'LNP. Una limitazione fondamentale è rappresentata dalle brevi finestre di osservazione, 48 ore per la biodistribuzione radiomarcata nei ratti e 9 giorni per l'espressione del reporter IVIS nei topi, che caratterizzano la distribuzione iniziale ma non stabiliscono la clearance o la persistenza a lungo termine [20].

Data l'ampia biodistribuzione dei vaccini a mRNA contro il COVID-19 [2,4-6], non sorprende che i pazienti affetti dalla sindrome post-vaccinale presentino generalmente un elenco di sintomi estremamente vario ed esaustivo, che crea difficoltà diagnostiche ai medici.
Inoltre, può essere difficile stabilire se i sintomi siano attribuibili al virus o al vaccino, dato che la stragrande maggioranza dei pazienti ha avuto sia un'infezione precedente che la vaccinazione. Il rilevamento degli anticorpi plasmatici contro la proteina nucleocapside del SARS-CoV-2 è il test più sensibile per individuare un'infezione precedente [21]. L'assenza dell'anticorpo nucleocapsidico indica una mancanza di immunità al virus stesso. Pertanto, in un paziente positivo alla proteina spike senza la presenza dell'anticorpo nucleocapsidico, la spike è attribuita alla vaccinazione piuttosto che all'infezione.

Un effetto trombogenico del virus SARS-CoV-2 è stato osservato nelle prime fasi della pandemia in casi di disturbi tromboembolici potenzialmente letali, tra cui embolie polmonari [22]. Le stesse condizioni sono state segnalate dopo la vaccinazione contro il COVID-19, probabilmente a causa della natura trombogenica della proteina spike [2,23]. Inoltre, è stato stabilito con certezza un nesso causale tra la vaccinazione contro il COVID-19 e la miocardite [8,24]. In uno studio multicentrico condotto su oltre 99 milioni di individui vaccinati, Faksova et al. hanno identificato un significativo segnale di sicurezza per la miocardite, con un aumento del rischio del 510% segnalato dopo la seconda dose di vaccini a mRNA contro il COVID-19 [25]. Sebbene il rischio cardiaco derivante dall'infezione da SARS-CoV-2 sia stato ampiamente descritto, è stato stabilito che i rischi cardiaci post-vaccinazione sono sostanzialmente maggiori [8]. Schauer et al hanno scoperto che, sebbene dopo la seconda dose del vaccino a mRNA Pfizer-BioNTech contro il COVID-19 si sia verificato un rapido miglioramento dei sintomi di miopericardite negli adolescenti, il 70% di essi presentava alterazioni cardiache persistenti alla risonanza magnetica a 3-8 mesi di follow-up [26]. Questi cambiamenti strutturali possono avere implicazioni prognostiche a lungo termine che rimangono poco comprese. Un quadro di stratificazione del rischio recentemente proposto affronta la crescente incidenza di arresto cardiaco improvviso in individui precedentemente sani dopo la vaccinazione, evidenziando la miocardite subclinica come probabile meccanismo, spesso non rilevabile con le tecniche di imaging standard o l'autopsia [27]. L'approccio sottolinea l'uso dei livelli di anticorpi, dei biomarcatori cardiaci e dell'imaging avanzato per identificare gli individui ad alto rischio. In particolare, il caso del nostro paziente ne sottolinea la rilevanza clinica: nonostante i biomarcatori normali e il test da sforzo cardiaco, la risonanza magnetica cardiaca ha confermato una miocardite attiva, evidenziando la sensibilità limitata della diagnostica di routine per rilevare il danno cardiaco associato al vaccino in questo paziente.

Il paziente ha ricevuto tre dosi del vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA, ciascuna riconducibile a numeri di lotto specifici associati a eventi avversi gravi documentati. Utilizzando lo strumento di ricerca *How Bad Is My Batch* collegato al VAERS [28], abbiamo identificato un numero significativo di casi segnalati di miocardite, embolia polmonare (PE), ricoveri ospedalieri e decessi per ciascun lotto:

1. **3 marzo 2021 — Lotto EN6202:** 11 miocarditi, 17 PE, 830 ricoveri ospedalieri, 180 decessi
2. **24 marzo 2021 — Lotto ER8727:** 5 miocarditi, 13 PE, 463 ricoveri ospedalieri, 97 decessi

3. **20 febbraio 2022 — Lotto FK9894:** 3 casi di miocardite, 5 casi di embolia polmonare, 186 ricoveri ospedalieri, 20 decessi

Questi dati suggeriscono un raggruppamento non casuale di segnalazioni di eventi avversi gravi che giustifica un'ulteriore analisi formale di farmacovigilanza. Dopo aver sospettato un danno correlato al vaccino, il paziente ha segnalato il caso al Vaccine Adverse Event Reporting System (VAERS).
Il personale addetto alla raccolta dei dati VAERS non ha registrato in dettaglio la natura multisistemica e longitudinale della malattia, concentrandosi invece sull'identificazione dell'ospedale in cui era stata effettuata la diagnosi per il follow-up. Il paziente riferisce di essere stato informato dal personale VAERS e dal Countermeasures Injury Compensation Program (CICP) che la segnalazione e l'ammissibilità alla richiesta di risarcimento erano limitate a un anno dopo la vaccinazione. In questo caso, il sospetto è sorto solo più di due anni dopo la vaccinazione e la raccolta delle prove a sostegno ha richiesto molto più tempo. In questo caso, il ritardo nel riconoscimento di una condizione multisistemica associata al vaccino si è scontrato con i tempi limitati per la segnalazione post-autorizzazione e le procedure di risarcimento, comprese le norme di segnalazione del VAERS e il Countermeasures Injury Compensation Program (CICP) collegato al PREP Act. Poiché il sospetto di un'eziologia correlata al vaccino è emerso più di due anni dopo la vaccinazione, la tempistica clinica del paziente non era in linea con diversi processi amministrativi dipendenti dal tempo, nonostante la persistente menomazione. Questo disallineamento temporale può influenzare l'accesso ai meccanismi di indennizzo e alle determinazioni dei benefici legati all'occupazione, tra cui l'indennizzo dei lavoratori, l'invalidità a lungo termine e la copertura supplementare per malattie gravi.

C'è stata una notevole discussione scientifica sulla persistenza della proteina spike SARS-CoV-2 nell'organismo dopo la vaccinazione con mRNA. **La tabella** 2 riassume i rilevamenti confermati riportati nella letteratura sottoposta a revisione paritaria. Le stime sulla durata della proteina spike variano notevolmente. Brogna et al. hanno rilevato frammenti di proteina spike ricombinante del vaccino in campioni di sangue fino a 187 giorni dopo la vaccinazione, indipendentemente dai titoli anticorpali [29]. Patterson et al. hanno identificato la subunità S1 della proteina spike nei monociti CD16+ fino a 245 giorni in individui con sindrome post-vaccinale da COVID-19 (PCVS) che erano risultati negativi al test per l'infezione da SARS-CoV-2 [7]. Ota et al. hanno segnalato l'espressione della proteina spike nelle arterie cerebrali fino a 17 mesi dopo la vaccinazione in pazienti con ictus emorragico, con assenza della proteina nucleocapside a conferma dell'origine non infettiva [4]. Bhattacharjee et al. hanno rilevato la proteina spike circolante nel plasma fino a 709 giorni dopo la vaccinazione con mRNA COVID-19 [30]. Tuttavia, il caso in esame rappresenta l'intervallo più lungo documentato fino ad oggi tra la vaccinazione con mRNA contro il COVID-19 e la conferma della presenza della proteina spike.

Studio (Anno)	**Rilevamento Sito**	**Metodo di rilevamento**	**Durata massima (giorni)**
Brogna et al. (2023) [29]	Plasma	Spettrometria di massa (frammenti peptidici PP-Spike)	187
Patterson et al. (2025) [7]	Monociti CD16	Citofluorimetria + LC-MS (subunità S1)	245
Ota et al. (2025) [4]	Arterie cerebrali arterie	Immunoistochimica + ibridazione in situ (mRNA spike)	518
Bhattacharjee et al. (2025) [30]	Plasma	Test immunologico SPEAR (Successive Proximity Extension Amplification Reaction) per il rilevamento di S1 e spike a lunghezza intera	709

Tabella 2. Persistenza documentata della proteina spike dopo la vaccinazione con mRNA contro il COVID-19

I pazienti affetti dalla sindrome hanno una storia clinica lunga e complessa che coinvolge molti medici e specialisti e che può avere o meno una correlazione temporale con il vaccino COVID-19. I loro sintomi possono essere descritti come relativamente vaghi e disgiunti, in particolare nella fase iniziale. Ai pazienti viene spesso diagnosticata ansia, depressione o un'altra condizione psichiatrica, oltre a numerose diagnosi apparentemente non correlate. Le sindromi post-vaccinazione possono coinvolgere numerosi sistemi organici, complicando la diagnosi e il trattamento. Il numero di specialisti con una formazione adeguata per valutare e gestire i casi multisistemici è limitato, il che può limitare l'accesso a cure appropriate. Non si può sottovalutare l'entità dello stress psicologico vissuto dai pazienti che devono affrontare una prolungata incertezza diagnostica.

L'analisi delle varianti strutturali dell'intero genoma è stata completata utilizzando LUMPY, che ha identificato 27.172 eventi candidati, rivelando molteplici alterazioni simili al numero di copie e riarrangiamenti complessi che ricordano l'instabilità genomica associata al cancro. Una grande duplicazione regionale che si estende sul cromosoma 7p (35,9-56,3 Mb) comprendeva il locus EGFR (SU 11), in linea con la somatica

Aumenti del numero di copie osservati frequentemente nei tumori solidi. Ulteriori duplicazioni e delezioni interstiziali multi-megabase sono state osservate nelle regioni che ospitano MYC (8q24), ERBB2/HER2 (17q12) ed ETV6/RUNX1 (12p13/21q22), tutti loci canonici correlati al cancro. Sebbene questi eventi di ampia portata possano rappresentare CNV di tipo tumorale, CNV germinali o artefatti di mappatura derivanti dall'analisi di un singolo campione, il loro modello di distribuzione DUP/DEL a livello di braccio e di breakend denso (BND) (18k eventi) è fortemente indicativo di fragilità cromosomica e attività di riparazione aberrante, in linea con la trasformazione oncogenica. Una piccola delezione di moderata affidabilità vicino al locus EGFR (chr7:55.219—55.214 Mb, SU = 47, SR = 31) supporta ulteriormente l'instabilità localizzata all'interno di questa regione oncogenica. Nel complesso, questi risultati dimostrano perturbazioni strutturali caratteristiche dei genomi tumorigenici, anche se una classificazione oncogenica definitiva richiederebbe un confronto con campioni normali corrispondenti, una convalida CNV basata sulla profondità e un'annotazione a livello genico. Data la limitazione del singolo campione dell'attuale set di dati, sono necessari campionamenti duplicati, validazioni ortogonali e rianalisi longitudinali per confermare la riproducibilità e la rilevanza biologica di questi eventi. Nel contesto della persistente disregolazione trascrittomica associata a picchi descritta in questo caso, questi modelli SV supportano un legame meccanicistico tra instabilità genomica, riparazione aberrante del DNA e suscettibilità oncogenica a seguito di stress molecolare prolungato post-vaccinazione [31-34]. Inoltre, il confronto tra RNA-seq e WGS abbinato ha identificato varianti di codifica solo RNA attraverso percorsi fondamentali: traduzione/ribosoma (EIF2A, EIF3A, EIF5, RPS14, NOP56, RRP9, RRP12, FBL), sorveglianza dell'mRNA/NMD (UPF1, UPF2, SMG1), elaborazione di piccoli RNA (DICER1, AGO2, DGCR8), regolazione epigenetica (CHD4, HDAC1, DNMT1) e TP53. Questi geni erano stati già segnalati nel nostro studio precedente [3]; pertanto, i percorsi a cui sono ancorati giustificano un'attenta analisi in questa coorte. Tutti i siti erano assenti nel DNA corrispondente, indicando un vero RNA-DNA. disallineamenti piuttosto che varianti germinali non chiamate.

Il profilo trascrittomico ha ulteriormente confermato il quadro clinico del paziente, rivelando una disregolazione dei geni chiave associati all'integrità mitocondriale, vascolare, intestinale e strutturale. La sottoregolazione di GPX4, un enzima antiossidante chiave, suggerisce un'alterazione dell'omeostasi redox e una maggiore suscettibilità alla ferroptosi, in linea con lo stress ossidativo mitocondriale osservato nella miocardite e nell'affaticamento cronico. L'upregulation dell'ACE indica uno squilibrio del sistema renina-angiotensina e una lesione endoteliale, meccanismi che promuovono l'infiammazione vascolare e la trombosi, in linea con la diagnosi di embolia polmonare. La ridotta espressione dell'APC compromette l'integrità dell'epitelio intestinale e la regolazione immunitaria, in linea con la disbiosi e l'infiammazione cronica del paziente.
Infine, la diminuzione **di LMNA,** essenziale per la stabilità nucleare nei cardiomiociti e nei neuroni, può essere alla base della disfunzione cardiaca persistente e dei sintomi neurocognitivi. Nel loro insieme, queste anomalie trascrittomiche forniscono un quadro molecolare che collega lo stress ossidativo, l'attivazione endoteliale, la rottura della barriera e l'instabilità nucleare alla patologia multisistemica post-vaccino mRNA del paziente.

L'analisi proteomica delle urine condotta l'11 settembre 2025 fornisce un'ulteriore conferma molecolare della persistente infiammazione sistemica e della disregolazione immunitaria in questo paziente. L'analisi ha utilizzato sia tecnologie proteomiche dirette che extracellulari (EV), un duplice approccio che migliora significativamente la sensibilità di rilevamento rispetto alla sola analisi diretta.

La spettrometria di massa quantitativa ha rivelato una firma proteomica infiammatoria distinta caratterizzata da una sovraregolazione dei mediatori immunitari innati (S100A8, S100A9, CAMP), del complemento e dei reagenti di fase acuta (C3, CFH, SERPINA1) e dei marcatori di stress ossidativo e danno endoteliale (PRDXI, APOE, HP, HPX). L'aumento concomitante dei componenti immunitari adattativi (IGHG1-4, IGHA1, B2M) suggerisce un'attivazione immunitaria cronica con produzione sostenuta di anticorpi e ricambio dei complessi immunitari. Nel complesso, questi risultati riflettono una continua interazione tra le vie immunitarie innate e adattive, lo stress ossidativo e la permeabilità vascolare, in linea con l'attivazione immunitaria in corso compatibile con l'esposizione antigenica persistente e la disfunzione endoteliale piuttosto che con la patologia renale. Modelli proteomici urinari simili sono stati riportati in condizioni di attivazione immunitaria cronica e sindromi infiammatorie post-virali, in cui si verifica un aumento della perdita glomerulare di proteine plasmatiche secondaria alla rottura endoteliale indotta dalle citochine **[35,36].** Le proteine identificate, in particolare CFH e PRDX1, sottolineano l'iperattivazione del complemento e lo squilibrio redox, meccanismi precedentemente implicati nelle sequele a lungo termine sia dopo l'infezione che dopo la vaccinazione. Pertanto, il profilo proteomico del paziente conferma un fenotipo infiammatorio sistemico concordante con i risultati trascrittomici e il decorso clinico della sindrome infiammatoria post-vaccino mRNA.

È stata inoltre eseguita un'analisi della predisposizione **HLA** e, in particolare, questo paziente è portatore di HLA-B*07:02 e HLA-DRB1*11:04, alleli che sono stati collegati ad un'attivazione immunitaria aberrante e a malattie infiammatorie croniche. L'HLA-B*07:02 (un allele di classe I) modella le risposte delle cellule T CD8' agli antigeni virali; ad esempio, è stato considerato l'allele più dominante negli individui infetti da SARS-CoV-2 [37]. È interessante notare che HLA-B07:02 può anche presentare alcuni peptidi indipendentemente dalla normale via di elaborazione dell'antigene dipendente dal TAP, una caratteristica insolita che potrebbe sostenere la presentazione dell'antigene anche quando i virus eludono l'elaborazione convenzionale [38]. Al contrario, B07:02 è stato implicato nell'autoimmunità: i pazienti affetti da sclerosi multipla mostrano una maggiore frequenza di HLA-B7 e una risposta disregolata delle cellule T CD8+ limitata a B07:02 al virus di Epstein-Barr [39], suggerendo che la clearance subottimale di questi peptidi mRNA persistenti in

I portatori di HLA-B7 possono contribuire all'infiammazione cronica del sistema nervoso centrale. Anche l'HLA-DRB1*11:04 (un allele di classe II) è associato a patologie immuno-mediate. Appartiene alla famiglia HLA-DR11, che è un forte fattore di rischio genetico per l'artrite idiopatica giovanile sistemica (una malattia infiammatoria causata dall'IL-1/IL-6) [40], e la variante DRB111:04 in particolare è stata collegata alla sclerosi sistemica [41]. Studi strutturali indicano che gli alleli DRB111 condividono caratteristiche uniche di legame peptidico che possono alterare la presentazione dell'epitopo, abbassando potenzialmente la soglia di attivazione delle cellule T CD4* autoreattive quando determinati antigeni persistono. Nel contesto del rilevamento prolungato della proteina spike e del DNA plasmidico residuo del vaccino in questo paziente, questi alleli HLA forniscono un plausibile contesto immunogenetico per l'infiammazione prolungata [42], determinando così una risposta infiammatoria cronica in questo contesto post-vaccinazione.

Conclusione

A nostra conoscenza, questo caso documenta la prova molecolare più completa della persistenza a lungo termine di molteplici componenti derivati dal vaccino dopo la vaccinazione con mRNA contro il COVID-19. La proteina spike, l'mRNA del vaccino e i frammenti di DNA plasmidico sono stati tutti rilevati più di 3,5 anni dopo l'ultima dose del vaccino Pfizer-BioNTech COVID-19 mRNA, superando di gran lunga la durata biologica prevista di queste molecole. Questi risultati relativi al vaccino e alla proteina spike sono stati ottenuti in diversi laboratori indipendenti in più momenti temporali utilizzando diverse metodologie analitiche su campioni di sangue e tessuti, a seguito di una valutazione diagnostica approfondita e ripetuta che ha incluso più di 40 visite al pronto soccorso, oltre 200 visite specialistiche in 18 discipline mediche, più di 100 esami di laboratorio non di routine, oltre 100 studi di diagnostica per immagini e funzionale e l'esclusione sistematica dei meccanismi eziologici sottostanti in ambito infettivo, autoimmune, reumatologico, endocrino, genetico, ematologico, maligno, tossico/correlato ai farmaci, cardiovascolare/vascolare, metabolico e neurologico primario. Le analisi molecolari condotte tra 852 e 1.364 giorni dopo la vaccinazione hanno dimostrato in modo coerente la persistenza di componenti derivati dal vaccino in campioni seriali di sangue e tessuti. Il rilevamento è stato ottenuto attraverso piattaforme ortogonali, tra cui ELISA ad alta sensibilità, immunoistochimica automatizzata con correlazione istopatologica, RT-PCR, **PCR** standard con conferma mediante sequenziamento Sanger, sequenziamento dell'intero genoma, profilazione trascrittomica e spettrometria di massa quantitativa, su plasma, esosomi circolanti, cellule mononucleate del sangue periferico, urina e biopsie cutanee seriali del tronco, dimostrando segnali molecolari convergenti tra tecnologie indipendenti e compartimenti biologici. La proteina spike è rimasta rilevabile nel plasma, negli esosomi e nelle biopsie cutanee seriali; l'mRNA derivato dal vaccino è persistito negli esosomi circolanti; e gli elementi di DNA plasmidico, inclusi frammenti del gene spike, origini di replicazione e l'enhancer SV40, sono stati identificati sia nelle cellule immunitarie che nel tessuto somatico. Test sierologici seriali effettuati tra 809 e 1.433 giorni dopo la vaccinazione hanno dimostrato livelli persistentemente elevati di anticorpi spike con cinque risultati separati negativi al nucleocapside in tre laboratori indipendenti, e la proteina nucleocapside era assente in tutti i campioni di tessuto spike-positivi. Questo sostenuto La negatività del nucleocapside sia nelle analisi sierologiche che in quelle tissutali esclude efficacemente una precedente infezione da SARS-CoV-2 come fonte della
proteina spike e del materiale genetico rilevati. Il rilevamento riproducibile e multi-compartimentale della proteina spike, delle sequenze di mRNA spike e degli elementi della struttura del plasmide che si estende oltre i 3,5 anni rappresenta una durata senza precedenti della persistenza molecolare dopo la vaccinazione con mRNA. Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che il materiale genetico derivato dal vaccino e i suoi prodotti proteici possono persistere in vivo per anni, mettendo in discussione le ipotesi di lunga data relative alla rapida eliminazione e all'inerzia biologica.

Dal punto di vista clinico, il paziente ha sviluppato una sindrome multiorganica progressiva - embolia polmonare, miocardite confermata dalla risonanza magnetica, deficit neurocognitivo, disbiosi gastrointestinale e infiammazione dermatologica cronica - che rispecchia l'evidenza molecolare di esposizione persistente all'antigene, disfunzione endoteliale e attivazione immunitaria sistemica. L'analisi multi-omica ha inoltre rivelato instabilità genomica strutturale, stress redox e mitocondriale, attivazione endoteliale e una firma proteomica di infiammazione cronica e danno vascolare. Il background immunogenetico del paziente (HLA-B07.‘02, ***HLA-DRB1*** 11:04) fornisce un ulteriore quadro di riferimento per la presentazione prolungata dell'antigene e l'aumentata reattività infiammatoria.

Combinati, questi risultati delineano un modello biologico unificato: la persistenza a lungo termine della proteina spike e degli acidi nucleici derivati dal vaccino, combinata con una disregolazione genomica, può causare stimolazione immunitaria cronica, infiammazione dei tessuti e disfunzione multisistemica in un sottogruppo di individui. Sebbene questi risultati richiedano una validazione in coorti più ampie con controlli abbinati, essi evidenziano lacune critiche nella nostra comprensione della biodistribuzione, della persistenza e delle conseguenze immunologiche a lungo termine dei vaccini a mRNA.

Sebbene limitato a un singolo paziente, questo caso sottolinea la necessità di una sorveglianza clinica costante, di un rigoroso biomonitoraggio molecolare e di studi longitudinali completi per determinare la prevalenza, i meccanismi e la rilevanza clinica dei componenti persistenti derivati dal vaccino. **È** necessaria una rivalutazione delle attuali ipotesi relative alla clearance, alla stabilità **e all'impatto sistemico dei vaccini** a mRNA per guidare la gestione degli individui che presentano sintomi cronici e inspiegabili dopo la vaccinazione.

Metodi

Preparazione del plasma e della frazione di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC)

Il sangue intero umano fresco isolato con EDTA (almeno 5 ml) è stato stratificato in provette da centrifuga coniche da 15 ml a temperatura ambiente sopra 5 ml di Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich #H8889). I campioni sono stati centrifugati a 400 ^ g per 30 minuti a temperatura ambiente in una centrifuga swing-out senza interruzioni. Lo strato superiore (plasma) è stato raccolto e congelato per ulteriori elaborazioni. Lo strato bianco cellulare di PBMC all'interfaccia del gradiente di densità del plasma è stato pipettato, trasferito in una provetta Eppendorf e centrifugato a 250 X g per 10 minuti. È stato quindi lavato due volte con una soluzione tampone fosfato. Il pellet di PBMC è stato lisato in tampone di lisi (20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% NP40, 1% Triton X-100, pH 7,4) per 30 minuti a 4 °C.

Isolamento degli esosomi

Gli esosomi sono stati isolati utilizzando una soluzione di precipitazione degli esosomi (Macherey-Nagel #740398) miscelando 1 ml di plasma con 400 pl di soluzione di precipitazione degli esosomi secondo le istruzioni del produttore. Il pellet di esosomi risultante è stato lisato in 20 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% NP40, 1% Triton X-100, pH 7,4, per 30 minuti a 4 °C per ottenere la frazione proteica, oppure ulteriormente trattato per l'isolamento di RNA o DNA.

ELISA della proteina Spike e rilevamento dell'anticorpo IgG4

La concentrazione della proteina spike nel plasma, negli esosomi e nei PBMC è stata determinata dalle frazioni proteiche utilizzando il test immunoenzimatico (ELISA) (Meso Scale Discovery). Il titolo anticorpale IgG4 contro la proteina spike nel plasma è stato quantificato utilizzando Acro Biosystems ELISA (#RAS-T017) secondo i protocolli del produttore.

Estrazione di DNA e RNA da tessuti, esosomi e PBMC

Il tessuto fissato in formalina in blocchi di paraffina è stato sezionato in cinque sezioni dello spessore di 10 pm, montate su vetrini Superfrost Plus e lasciate asciugare all'aria per una notte o più a lungo. Dopo la rimozione della paraffina e la reidratazione delle sezioni di tessuto in soluzione salina tamponata con fosfato per 48 ore, il tessuto è stato trasferito in una provetta Eppendorf e il liquido è stato completamente eliminato mediante centrifugazione.

L'RNA totale è stato estratto dagli esosomi, dalle PBMC o dai tessuti utilizzando il kit NucleoSpin RNA Plus XS o il kit NucleoSpin Total RNA FFPE XS con colonna di rimozione del gDNA (Macherey-Nagel #74099, #740969) secondo le istruzioni del produttore. Durante questa procedura, è stata inclusa un'ulteriore fase di trattamento con DNasi I per 15 minuti a temperatura ambiente per rimuovere i frammenti residui di DNA plasmidico. L'RNA è stato trascritto in cDNA (Applied Biosystems #4387406) e l'analisi dell'espressione genica è stata eseguita mediante reazione a catena della polimerasi (PCR).

Il DNA plasmidico è stato estratto dagli esosomi e dalle PBMC utilizzando il GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific). Il DNA genomico è stato isolato da sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina o da PBMC mediante precipitazione con isopropanolo. In breve, i tessuti sono stati lisati con proteinasi K in tampone TES (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, pH 8,0) per 3-5 ore a 56 °C. Dopo l'aggiunta di NaCl 6 M, le soluzioni sono state agitate con un vortex e centrifugate per 5 minuti per ottenere una soluzione limpida, che è stata poi ulteriormente trattata con isopropanolo. Il DNA genomico è stato precipitato mediante centrifugazione (15 minuti; 13.000 rpm), lavato con etanolo al 70%, essiccato all'aria ed eluito in acqua.

Analisi dell'espressione genica

L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita utilizzando la reazione a catena della polimerasi con Taq polimerasi (Biozym #331610) e i seguenti primer:

Sequenza della proteina spike 1 (22 lbp)	**fw CCTACACCAACAGCTTTACC** **rev GATGTTGGACTTCTCGGTGC**
Sequenza della proteina spike 2 (251 bp)	**fw ACGTGGTCAACCAGAATGCC** **rev CACACACTCAGACATCTTGG**
Sequenza della proteina spike 3 (362 bp)	**fw GAACTTCAACTTCAACGGCC** **rev AGCTATTGTTCACGTGCTCG**

Sequenza di origine della replicazione 1 (105 bp)	**fw CTACATACCTCGCTCTGCTAATC** **rev GCGCCTTATCCGGTAACTATC**
Replicazione della sequenza di origine 2 (204 bp)	**fw CTACATACCTCGCTCTGCTAATC** **rev CGCTTTCTCATAGCTCACGC**
Sequenza potenziatrice SV40 (311 bp)	fw CCAGCTGTGGAATGTGTGTC **rev GCTGACTAATTGAGATGCATGC**

Come controllo positivo è stata utilizzata una fiala contenente il lotto GH9715, poiché il DNA plasmidico di questo lotto era già stato isolato e sequenziato e confermato come corrispondente alla sequenza plasmidica BNT162b2 (GenBank PP544445.1, GenBank PP544446.1, GenBank MQ287666.1 che rappresenta la sequenza 16 del brevetto WO2021214204). Le reazioni PCR sono state caricate su un gel di agarosio al 2% con bromuro di etidio.

Istologia di routine

I tessuti fissati in formalina sono stati trattati in modo routinario e i tessuti inclusi in paraffina sono stati tagliati in sezioni da 5 pm e colorati con ematossilina ed eosina (H&E) per l'esame istopatologico.

Immunoistochimica

La colorazione immunoistochimica è stata eseguita sulle biopsie cutanee utilizzando un sistema di immunoistochimica completamente automatizzato (Ventana Benchmark, Roche). Per entrambi gli anticorpi è stato utilizzato un recupero dell'antigene (Ultra CC1, Roche Ventana). L'incubazione con l'anticorpo primario (subunità 1 della proteina spike SARS-CoV-2, ProSci, #9083 e proteina nucleocapside SARS-CoV-2, ProSci, #35-720) è stata effettuata per 30 minuti in ciascun caso. Le cellule coltivate che erano state trasfettate *in vitro* sono servite come controllo positivo per la rilevazione dell'espressione della proteina spike indotta dal vaccino e come controllo negativo per la rilevazione della proteina nucleocapside (dati non mostrati). I vetrini sono stati esaminati con un microscopio ottico (Nikon ECLIPSE 80i) e le immagini rappresentative sono state acquisite dal sistema di telecamere Motic Europe Motic MP3.

Prelievo e spedizione dei campioni

I campioni per la biopsia con punch sono stati prelevati dalla cute del tronco in aree clinicamente attive della malattia di Grover prima della raccolta del sangue, a causa dei requisiti di manipolazione sensibili al fattore tempo dei test basati sul sangue. I campioni di sangue dovevano pervenire al laboratorio di analisi entro 48-72 ore e sono stati spediti il giorno stesso del prelievo. Le biopsie tissutali fissate in formalina sono relativamente stabili e sono state spedite insieme ai campioni di sangue, quando possibile, o separatamente quando non venivano effettuati esami del sangue. Tutte le spedizioni sono state effettuate utilizzando imballaggi isolati con sacchetti di ghiaccio per il mantenimento passivo della temperatura e contenitori secondari sigillati. Tutti i campioni di sangue sono stati consegnati entro due giorni dalla spedizione.

I campioni di sangue sono stati prelevati il 7 maggio 2025 (campione di sangue 1) e il 26 agosto 2025 (campione di sangue 2) e spediti il giorno stesso del prelievo. I campioni di biopsia tissutale sono stati prelevati il 24 aprile 2025 (campione tissutale 1), il 22 luglio 2025 (campione tissutale 2) e il 14 novembre 2025 (campione tissutale 3). Il campione di tessuto 1 è stato spedito insieme al campione di sangue 1, il campione di tessuto 2 è stato spedito insieme al campione di sangue 2 e il campione di tessuto 3 è stato spedito separatamente subito dopo il prelievo.

Riferimenti

1. Ho, R.J.Y. Sviluppo del vaccino Covid-19 a velocità warp: beneficiari della maturazione delle tecnologie biofarmaceutiche e delle partnership pubblico-private. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021,** *110,* 615-618, doi:10.1016/j.xphs.2020.11.010.
2. Parry, P.I.; Lefringhausen, A.; Turni, C.; Neil, C.J.; Cosford, R.; Hudson, N.J.; Gillespie, J. "Spikeopatia": la proteina spike del COVID-19 è patogena, sia dal virus che dall'mRNA del vaccino. *Biomedicines* **2023,** *11,* 2287, doi:10.3390/biomedicines11082287.
3. Von Ranke NL, Zhang W, Anokhin P, et al. Vaccini sintetici a RNA messaggero e disregolazione trascrittomica: prove da eventi avversi di nuova insorgenza e tumori post-vaccinazione. *World JExp Med.* 2025;15(4):113869. Pubblicato il 20 dicembre 2025. doi:10.5493/wjem.vl5.i4.113869
4. Ota, N.; Itani, M.; Aoki, T.; Sakurai, A.; Fujisawa, T.; Okada, Y.; Noda, K.; Arakawa, Y.; Tokuda, S.; Tanikawa, R. Espressione della proteina spike SARS-CoV-2 nelle arterie cerebrali: implicazioni per l'ictus emorragico dopo la vaccinazione con mRNA. *Journal of Clinical Neuroscience* **2025,** *136,* 111223, doi:10.1016/j.jocn.2025.111223.
5. Krauson, A.J.; Casimero, **F.V.C.;** Siddiquee, Z.; Stone, J.R. Durata della persistenza del vaccino **a mRNA** contro il SARS-CoV-2 e fattori associati al coinvolgimento cardiaco in pazienti recentemente vaccinati. *npj Vaccines* **2023,** *8,* doi:10.1038/s41541-023-00742-7.
6. Luo, J.; Molbay, M.; Chen, Y.; Horvath, I.; Kadletz, K.; Kick, B.; Zhao, S.; Al-Maskari, R.; Singh, I.; Ali, M.; et al. Imaging dei nanovettori con risoluzione a livello di singola cellula su interi corpi di topi con deep learning. *Nature Biotechnology* **2025,** doi:10.1038/s41587-024- 02528-1.
7. Patterson, B.K.; Yogendra, R.; Francisco, E.B.; Guevara-Coto, J.; Long, E.; Pise, A.; Osgood, E.; Bream, J.; Kreimer, M.; Jeffers, D.; et al. Rilevazione della proteina spike S1 nei monociti CD16+ fino a 245 giorni in individui negativi al SARS-CoV-2 affetti da sindrome post-vaccinale da COVID-19 (PCVS). *Human Vaccines **&** Immunotherapeutics* **2025,** ***21,*** doi:10.1080/21645515.2025.2494934.
8. Mead, M.N. Miocardite dopo infezione da SARS-CoV-2 e vaccinazione contro il COVID-19: epidemiologia, esiti e nuove prospettive. *International Journal of Cardiovascular Research & Innovation* **2025,** doi:10.61577/ijcri.2025.100001.
9. Hazan, S.; Dave, S.; Barrows, B.; Borody, T.J. S2099 Danni persistenti al microbioma intestinale in seguito al vaccino a mRNA SARS-CoV-2. *American Journal of Gastroenterology* **2022,** *117,* e1429-e1430, doi:10.14309/01.ajg.0000865036.78992.16.
10. Centri per il controllo e la prevenzione delle malattie. *Linee guida provvisorie per i test anticorpali COVID-19.* Aggiornato il 16, 2022. CDC. https://archive.cdc.gov/www cdc ov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing/antibody-tests-guidelines.html. Accesso effettuato il 30 gennaio 2026.
11. Bolze, A.; Neveux, I.; Schiabor Barrett, K.M.; White, S.; Isaksson, M.; Dabe, S.; Lee, W.; Grzymski, J.J.; Washington, N.L.; Cirulli, E.T. HLA-A•03:01 è associato a un aumento del rischio di febbre, brividi e effetti collaterali più forti da vaccinazione Pfizer-BioNTech COVID-19.
12. Yasuda, S.; Suzuki, S.; Yanagisawa, S.; Morita, H.; Haisa, A.; Satomura, A.; Nakajima, R.; Oikawa, Y.; Inoue, I.; Shimada, A. Tipizzazione HLA di pazienti che hanno sviluppato tiroidite subacuta e malattia di Graves dopo la vaccinazione contro il SARS-CoV-2: un caso clinico. ***BMC Endocrine** Disorders* **2023,** ***23,*** 54, doi:10.1186/s12902-023-01287-5.
13. Bianco, A.; Di Sante, G.; Colò, F.; De Arcangelis, V.; Cicia, A.; Del Giacomo, P.; De Bonis, M.; Morganti, T.G.; Carlomagno, Y; Lucchini, M.; et al. Insorgenza della sclerosi multipla prima e dopo la vaccinazione contro il COVID-19: l'aplotipo **HLA** può essere determinante?
    *International Journal of Molecular **Sciences*** **2024,** ***25,*** doi:10.3390/ijms25084556.
14. Magri, C.A.-O.; Marchina, E.; Sansone, E.; D'Adamo, A.P.; Cappellani, S.; Bonfanti, C.; Terlenghi, L.; Biasiotto, G.; Zanella, I.; Sala, E.; et al. Studi di associazione genomica sulla risposta e gli effetti collaterali al vaccino BNT162b2 negli operatori sanitari italiani: aumento dei livelli di anticorpi ed effetti collaterali nei portatori dell'allele **HLA-A*03:01**.
15. Hulscher, N.; Procter, B.C.; Wynn, C.; McCullough, P.A. Approccio clinico alle sequele post-acute dopo l'infezione da COVID-19 e la vaccinazione. *Cureus* **2023,** doi:10.7759/cureus.49204.

16. Hulscher, N.; Bowden, M.; McCullough, P. Revisione: si intensificano le richieste di ritiro dal mercato dei vaccini contro il COVID-19, poiché i rischi superano di gran lunga i benefici teorici. **2025, *6.***
17. Aldén, M.; Olofsson Falla, F.; Yang, D.; Barghouth, M.; Luan, C.; Rasmussen, M.; De Marinis, Y. Trascrizione inversa intracellulare del vaccino a mRNA Pfizer BioNTech COVID-19 BNT162b2 in vitro in una linea cellulare epatica umana. *Questioni attuali in biologia molecolare* **2022,** *44,* 1115-1126, doi:10.3390/cimb44030073.
18. Anthony M. Kyriakopoulos, P.A.M., Greg Nigh, Stephanie Seneff. Potenziali meccanismi di integrazione nel genoma umano del codice genetico del vaccino a mRNA SARS-CoV-2: implicazioni per la malattia. *Disturbi neurologici* **2022,** *10,* doi:10.4172/2329- 6895.10.10.519.
19. Catanzaro JA, Hulscher N, McCullough PA. Integrazione genomica e disregolazione molecolare nel cancro alla vescica aggressivo in stadio IV a seguito della vaccinazione con mRNA COVID-19. Int J Innov Res Med Sci. 2025;10(10):380-386. doi:10.23958/ijirms/vol10-i10/2130.
20. Agenzia europea per i medicinali. *Comirnaty: vaccino a mRNA contro il COVID-19 (modificato con nucleosidi). Relazione di valutazione.* EMA/707383/2020 Corr.2. Pubblicato il 19 febbraio 2021. Aggiornato il 20 ottobre 2023. Consultato il 30 gennaio 2026.
21. Burbelo, P.D.; Riedo, F.X.; Morishima, C.; Rawlings, S.; Smith, D.; Das, S.; Strich, J.R.; Chertow, D.S.; Davey, R.T.; Cohen, J.I. Sensibilità nella rilevazione degli anticorpi contro le proteine nucleocapside e spike del coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave in pazienti con malattia da coronavirus 2019. *The Journal of Infectious Diseases* **2020,** *222,* 206-213, doi:10.1093/infdis/jiaa273.
22. Sutanto, H.; Soegiarto, G. Rischio di trombosi durante e dopo un'infezione da SARS-CoV-2: patogenesi, approccio diagnostico e gestione. *Hematology Reports* **2023,** *75,* 225-243, doi:10.3390/hematolrepl5020024.
23. Rogers, C.; Thorp, J.; Cosgrove, K.; McCullough, P. Vaccini COVID-19: un fattore di rischio per le sindromi trombotiche cerebrali. *International Journal of Innovative Research **in Medical Science*** **2024, *9,*** 621 - 627, doi:10.23958/ijirms/vol09-i11/1982.
24. CDC. Considerazioni cliniche: miocardite e pericardite dopo la somministrazione dei vaccini contro il COVID-19 ad adolescenti e giovani adulti. **2023.**
25. Faksova, K.; Walsh, D.; Jiang, Y.; Griffin, J.; Phillips, A.; Gentile, A.; Kwong, J.C.; Macartney, K.; Naus, M.; Grange, Z.; et al. Vaccini contro il COVID-19 ed eventi avversi di particolare interesse: uno studio multinazionale di coorte del Global Vaccine Data Network (GVDN) su 99 milioni di individui vaccinati. *Vaccine* **2024,** *42,* 2200-2211, doi:10.1016/j.vaccine.2024.01.100.
26. Schauer, J.; Buddhe, S.; Gulhane, A.; Sagiv, E.; Studer, M.; Colyer, J.; Chikkabyrappa, S.M.; Law, Y.; Portman, M.A. Risultati persistenti della risonanza magnetica cardiaca in una coorte di adolescenti con miopericardite post-vaccino mRNA contro la malattia da coronavirus 2019. *The Journal of Pediatrics* **2022,** *245,* 233-237, doi:10.1016/j.jpeds.2022.03.032.
27. McCullough, P.A.; Hulscher, N. Stratificazione del rischio di arresto cardiaco futuro dopo la vaccinazione contro il COVID-19. *World Journal of Cardiology* **2025,** *17,* doi:10.4330/wjc.v17.i2.103909.
28. Paardekooper, C. Quanto è grave il mio lotto? Disponibile online: https://knollfrank.github.io/HowBadIsMyBatch/HowBadIsMyBatch.html
29. Brogna, C.; Cristoni, S.; Marino, G.; Montano, L.; Viduto, Y; Fabrowski, M.; Lettieri, G.; Piscopo, M. Rilevazione della proteina Spike ricombinante nel sangue di individui vaccinati contro SARS-CoV-2: possibili meccanismi molecolari. ***PROTEOMICS** — Applicazioni **cliniche*** **2023, *17,*** doi:10.1002/prca.202300048.
30. Bhattach@ee, B.; Lu, P.; Monteiro, V.S.; Tabachnikova, A.; Wang, K.; Hooper, W.B.; Bastos, V.; Greene, K.; Sawano, M.; Guirgis, C.; et al. Segni immunologici e antigenici associati a malattie croniche dopo la vaccinazione contro il COVID-19. **2025,** doi:10.1101/2025.02.18.25322379.
31. Liu, B.; Conroy, J.M.; Morrison, C.D.; Odunsi, A.O.; Qin, M.; Wei, L.; Trump, D.L.; Johnson, C.S.; Liu, S.; Wang, J. Scoperta di variazioni strutturali nel genoma del cancro utilizzando il sequenziamento di nuova generazione: soluzioni computazionali e prospettive.
32. Eleveld, T.A.-O.; Ylstra, B.A.-O.; Looijenga, L.H.J. Gli aumenti di numero di copie a bassa ampiezza modellano il cancro attraverso oncogeni noti e nuovi con vulnerabilità terapeutiche associate. LID - 10.1093/nar/gkaf689 [doi] LID - gkaf689.
33. Patkar, S.; Heselmeyer-Haddad, K.; Auslander, N.; Hirsch, D.; Camps, J.; Bronder, D.; Brown, M.; Chen, W.-D.; Lokanga, R.; Wangsa, D.; et al. Il cablaggio fisso dei livelli di espressione genica specifici dei tessuti normali a livello cromosomico è un ulteriore fattore che determina aneuploidie specifiche per tipo di cancro. *Genome **Medicine*** **2021, *13,* 93,** doi:10.l186/s13073-021- 00905-y.

34. Zhang, C.-Z.; Spektor, A.; Cornils, H.; Francis, J.M.; Jackson, E.K.; Liu, S.; Meyerson, M.; Pellman, D. Cromotripsia da danno al DNA nei micronuclei. *Nature* **2015,** ***522,*** 179-184, doi:10.1038/nature14493.
35. Joshi, N.; Garapati, K.; Ghose, Y; Kandasamy, R.K.; Pandey, A. Recenti progressi nella proteomica urinaria basata sulla spettrometria di massa. *Proteomica* ***clinica*** **2024,** *21,* doi:10.1l86/s12014-024-09462-z.
36. Zhao, M.; Li, M.; Yang, Y.; Guo, Z.; Sun, Y.; Shao, C.; Li, M.; Sun, W.; Gao, Y. analisi completa e annotazione del proteoma urinario umano normale. *Scientific Reports* **2017,** Z, doi:10.1038/s4l598-0l7-03226-6.
37. Peng, Y.; Felce, S.L.; Dong, D.; Penkava, F.; Mentzer, A.J.; Yao, X.; Liu, G.; Yin, Z.; Chen, J.-L.; Lu, Y.; et al. Una risposta immunodominante delle cellule T citotossiche NP105-113-B*07:02 controlla la replicazione virale ed è associata a una forma meno grave di COVID-19. *Nature Immunology* **2021,** *23,* 50-61, doi:10.1038/s4l590-021-01084-z.
38. de la Salle, H.; Houssaint, E.; Peyrat, M.A.; Arnold, D.; Salamero, J.; Pinczon, D.; Stevanovic, S.; Bausinger, H.; Fricker, D.; Gomard, E.; et al. Carenza del trasportatore peptidico umano: importanza **dell'HLA-B** nella presentazione degli antigeni EBV indipendenti dal TAP. *The Journal* ***ofImmunology*** **1997,** *158,* 4555-4563, doi:10.4049/jimmunol.158.10.4555.
39. Jilek, S.; Schluep, M.; Harari, A.; Canales, M.; Lysandropoulos, A.; Zekeridou, A.; Pantaleo, G.; Du Pasquier, R.A. HLA-B7—Le cellule T CD8+ specifiche per l'EBV sono disregolate nella sclerosi multipla. *The Journal of Immunology* **2012,** *188,* 4671-4680, doi:10.4049/jimmunol.1103100.
40. Ombrello, M.J.; Remmers, **E.F.;** Tachmazidou, I.; Grom, A.; Foell, D.; Haas, J.-P.; Martini, A.; Gattorno, M.; Özen, S.; Prahalad, S.; et al. HLA-DRB1*11 e varianti del locus MHC di classe II sono forti fattori di rischio per l'artrite idiopatica giovanile sistemica. *Atti dell'Accademia Nazionale delle Scienze* **2015,** ***112,*** 15970-15975, doi:10.1073/pnas.1520779112.
41. Machhua, S.; Sharma, S.K.; Kumar, Y.; Singh, S.; Aggarwal, R.; Anand, S.; Kumar, M.; Singh, H.; Minz, R.W. Associazione dell'antigene leucocitario umano nei pazienti affetti da sclerosi sistemica: la nostra esperienza in un centro di cure terziarie nell'India settentrionale. *Frontiers in Immunology* **2023,** *14,* doi:10.3389/fimmu.2023.1179514.
42. Georgopoulos, A.; James, L.; Peterson, P. L'antigene leucocitario umano (HLA) alla base degli antigeni persistenti e del COVID lungo. *Journal of Immunological Sciences* **2025,** *9,* 1- 3, doi:10.29245/2578-3009/2025/1.1257.

MATERIALE SUPPLEMENTARE

Tabella S1. Attivazione immunitaria innata (segnalazione dei neutrofili e dei macrofagi). Legenda: PSM (Peptide-Spectrum Match) riflette il numero di frammenti peptidici rilevati per ciascuna proteina. **Il rapporto di abbondanza (EV / urina)** indica l'arricchimento proteico nelle vescicole extracellulari urinarie rispetto all'urina totale, mentre **il valore P corretto** indica la significatività statistica di questa differenza dopo la correzione per test multipli.

Gene	Descrizione	PSM	Abbondanz	Rapporto Ra	Valore P aggiustato
S100A8	Proteina proinfiammatoria legante il calcio; attiva TLR4 e RAGE	a	5,709		0,84659819
S100A9	Partner di S100A8; promuove la chemiotassi dei neutrofili e la citochina lease.	457	5,922		0,83834255
S100A12	Induce l'attivazione endoteliale tramite RAGE; amplifica innato	112	9,82		0,74715833
CD14	Co recettore LPS per TLR4; avvia l'attivazione del sistema immunitario innato.	60	5,061		0,86160805
CAMP	Peptide antimicrobico LL-37; recluta neutrofili e modula kines.		10.542		0,72460914
LTF	Lattoferrina; antimicrobico e antinfiammatorio tein.	653	10,435		0,72865898
HP	Aptoglobina; elimina l'emoglobina libera per limitare l'ossidazione, zione.	280	0,229		0,49508305
HPX	Emopessina; lega l'eme libero per ridurre l'infiammazione mediata dai ROS.	129	0,54		0,75760585
GSN	Gelsolina; controlla il rilascio di actina e attenua le cascate infiammatorie.	299	2,011		0,98343522
ORM1	Orosomucoide 1; reagente di fase acuta che modula l'adesione dei neutrofili.	96	0,049		0,09312903
ANXA1	Annexina A1; indotta dai glucocorticoidi, favorisce la risoluzione dell'infiammazione	58	13,225		0,65892721
ANXA2	Regola la riparazione della membrana e la segnalazione delle citochine dei macrofagi.	84	6,406		0,82775716
PIGR	Trasporta IgA/IgM attraverso la mucosa; collega il sistema immunitario innato e quello mucosale.	279	0,845		0,83937768

Tabella S2. Complemento e risposta di fase acuta. Legenda: PSM (Peptide-Spectrum Match) riflette il numero di frammenti peptidici rilevati per ciascuna proteina. **Il rapporto di abbondanza (EV / Urina)** indica l'arricchimento proteico nelle vescicole extracellulari urinarie rispetto all'urina totale, mentre **il valore P corretto** indica la significatività statistica di questa differenza dopo la correzione per test multipli.

Gene	Descrizione	PSM	Rb ndance	Rapporto di abbondanza P-	valore corretto
C3	Componente del complemento Cen al; favorisce l'opsonizzazione e l'infiammazione 6,668	221			0,86104676
CFH	Fattore H del complemento; inibisce l'eccessiva attivazione della via		8,563		0,49508305
CFI	alternativa	69	2,535		0,75760585
SERPINA1	I; degrada C3b e C4b attivati per prevenire	70	0,308		0,86104676
SERPINA3			1,966		0,97499333
SERPING1	C1		4,309		0,79175269
MASP2	Inibitore della serina proteasi in fase acuta; modula l'infiammazione.	106			
FGA	Inibitore: previene l'attivazione spontanea del complemento cas- bade.	153	0,172		0,65892721
FGB	Attivatore della via delle lectine; avvia la scissione di C4/C2.	70	3,167		0,97077855
	Catena alfa del fibrinogeno; marcatore dell'infiammazione sistemica.	191	4,792		0,09346852
	b Catena beta del SiSogen; coinvolta nella coagulazione e nell'inflammothrom-	147			
FGG	Catena Fb n e gamma; favorisce l'aggregazione piastrinica durante l'in-	191	8,724		0,86104676
A2M	Inibitore della drumproteasi che regola il complemento e il citotossico	119	0,53		0,49508305
ORM1	Glicoproteina della fase C coinvolta nella modulazione della risposta infiammatoria	96	0,049		0,75760585

Tabella S3. Infiammazione legata allo stress ossidativo. Legenda: PSM (Peptide-Spectrum Match) riflette il numero di frammenti peptidici rilevati per ciascuna proteina. **Il rapporto di abbondanza (EV / Urina)** indica l'arricchimento proteico nelle vescicole extracellulari urinarie rispetto all'urina totale, mentre **il valore P corretto** indica la significatività statistica di questa differenza dopo la correzione per test multipli.

Gene	Descrizione	PSM	Rapporto di abbondanza	Rapporto di abbondanza P-	valore aggiustato
PRDX1	Pe o redoxin1; enzima antiossidante che mitiga i ROS durante l'infiammazione	66	5,147		0,86104676
HP	Riduce lo stress ossidativo legandosi all'emoglobina libera.	280	0,229		0,49508305
HPX	Elimina l'eme, prevenendo il danno ossidativo endoteliale.	129	0,54		0,75760585
APOE	M d at attivazione dei macrofagi e infiammazione ossidativa associata ai lipidi	108	5,321		0,86104676
APOA1	Componente HDL antinfiammatoria con proprietà antiossidanti.	192	1,858		0,97499333
APOA4	Regola il metabolismo dei lipidi e l'equilibrio ossidativo nell'infiammazione.	276	7,992		0,79175269

ANXA1	Promuove la fase di risoluzione e riduce il danno indotto dai ROS.	58	13,225	0,65892721
EFEMP1	Regolatore associato all'ECM della segnalazione ossidativa nello stress tissutale.	160	1,768	0,97077855
PTGDS	Produce prostaglandina D2; regola l'ossidazione e l'infiammazione equilibrio.	463	0,05	0,09346852

Tabella S4. Regolazione adattativa mediata dagli anticorpi. Legenda: PSM (Peptide-Spectrum Match) riflette il numero di frammenti peptidici rilevati per ciascuna proteina. **Il rapporto di abbondanza (EV / Urina)** indica l'arricchimento proteico nelle vescicole extracellulari urinarie rispetto all'urina totale, mentre **il valore P corretto** indica la significatività statistica di questa differenza dopo la correzione per test multipli.

Gene	**Funzione**	**PSM**	**Rapporto di abbondanza** tio	**Abbondanza Ra-** tio P-Value aggiustato
IGHG1	Catena pesante dell'immunoglobulina gamma 1; media l'immunità adattativa.	396	1,153	0,89379678
IGHG2	Immunoglobulina gamma 2; sottotipo di anticorpo che fissa l'emero. sottotipo di anticorpo che fissa l'emoglobina.	493	0,419	0,70285101
IGHG3	Immunoglobulina gamma 3; potente attivatore del complesso immunitario.	270	3,147	0,96043029
IGHA1	Catena pesante IgA secretoria; protegge le superfici mucose.	182	0,517	0,75721935
IGHG4	Non com. IgG che non fissa l'elemento; modula l'attivazione immunitaria cronica.	80	1,004	0,87059901
IGHA2	Sottotipo IgA secondario; mantiene la tolleranza immunitaria delle mucose.	80	3,457	0,94332212
IGHM	Catena pesante IgM; anticorpo della risposta immunitaria adattativa precoce.	132	1,045	0,87549605
IGKC	Immunoglobulina kappa costante; catena leggera per l'assemblaggio degli anticorpi.	159	0,558	0,76189784
IGLC2	Catena leggera lambda; componente degli anticorpi adattativi.	82	0,762	0,82775716
IGLLS	Polipeptide 5 simile all'immunoglobulina lambda; coinvolto nella segnalazione delle cellule B.	94	0,44	0,71565047
B2M	Beta-2 microglobulina; componente dell'MHC I, riflette l'immunità.	115	0,818	0,83474445
CD55	Fattore di accelerazione del decadimento; protegge le cellule dalla degradazione mediata dal complemento.	117	0,025	0,03422473
CD59	Inibisce la formazione del complesso di attacco di membrana; previene le lesioni autologhe.	24	0,045	0,08269538
PIGR	Collega la secrezione di anticorpi della mucosa alla difesa innata.	279	0,845	0,83937768